

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 03/018635 A1**

(51) 国際特許分類: C07K 16/28, C12N 5/10, 15/13, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, G01N 33/53

東京都 町田市 旭町三丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08828

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI, Shohei et al.); 〒107-6028 東京都 港区 赤坂一丁目 1 2 番 3 2 号 アーク森ビル 2 8 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-265144 2001 年 8 月 31 日 (31.08.2001) JP

(71) 出願人: 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都 千代田区 大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: 設楽 研也 (SHITARA, Kenya); 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 中村 和靖 (NAKAMURA, Kazuyasu); 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 保坂 絵美 (HOSAKA, Emi); 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 田中 晶子 (TANAKA, Akiko); 〒194-8533 東京都 町田市 旭町三丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 小池 正道 (KOIKE, Masamichi); 〒194-8533

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN CDR-GRAFTED ANTIBODIES AND ANTIBODY FRAGMENTS THEREOF

(54) 発明の名称: ヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片

(57) Abstract: A human CDR-grafted antibody which specifically reacts with the extracellular region of human CC chemokine receptor 4 (CCR4) but shows no reactivity with human platelets or its antibody fragment; a human CDR-grafted antibody which specifically reacts with the extracellular region of human CC chemokine receptor 4 (CCR4) and shows cytotoxicity on cells expressing CCR4 or its antibody fragment; and drugs, remedies and diagnostics containing at least one member selected from these antibodies and antibody fragments as the active ingredient.

(57) 要約:

ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、ヒト血小板に反応性を示さないヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片、CCR4 の細胞外領域に特異的に反応し、CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示すヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片、および該抗体および該抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する医薬、治療薬、診断薬。



WO 03/018635 A1

## 明 細 書

### ヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片

#### 技術分野

本発明は、ヒトの CC ケモカイン受容体 4（以下、CCR4 と表記する）の細胞外領域に対して特異的に反応し、血小板に反応性を有さないヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片に関する。また、本発明は、ヒトの CCR4 の細胞外領域に対して特異的に反応し、CCR4 リガンドである TARC または MDC の CCR4 への結合を阻害する活性を有さないヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は細胞傷害活性、Th2 細胞によるサイトカイン産生抑制を示し、特定の相補性決定領域（以下、CDR と表記する）を含む、CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は上記の抗体およびその抗体断片をコードする DNA 配列に関する。さらに、本発明は、該 DNA 配列を含んでなるベクターおよび該ベクターにより形質転換された形質転換体に関する。さらに、本発明は該形質転換体を用いた上記の抗体およびその抗体断片の製造方法、ならびに該抗体およびその抗体断片を用いるアレルギー性疾患を始めとする Th2 介在性免疫疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。さらに、本発明は、該抗体およびその抗体断片を用いる白血病、リンパ腫等の血液癌を始めとする癌疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。

#### 背景技術

気管支喘息を始めとするアレルギー疾患には好酸球や肥満細胞、IgE など様々な因子が関与している。好酸球は炎症局所に浸潤し、脱顆粒により MBP (major basic protein) 等の細胞傷害性塩基性蛋白質を放出して周囲の組織傷害を誘発する。肥満細胞は、B 細胞から産生された IgE と抗原との免疫複合体と結合することでヒスタミンを放出し、即時型アレルギー反応を誘発する。ア

アレルギー反応をコントロールしているのはサイトカイン・ケモカイン等の生体機能分子である。生体機能分子は細胞間の情報伝達を担っている。IL-5 は好酸球を分化誘導し、寿命を延長させ、さらに脱顆粒を誘発する。IL-4 は B 細胞を活性化し、IgE を生産させる。生産された IgE は、抗原との免疫複合体となり肥満細胞の脱顆粒を促す。また肥満細胞から生産される IL-4、IL-13 などは、B 細胞からの IgE 産生に寄与することが判明している (Am. J. Respir. Crit. Care Med., 152, 2059 (1995)、Immunol. Today, 15, 19 (1994))。このように炎症性細胞間には巧妙なサイトカイン・ケモカインネットワークが存在し、複雑にバランスを保っている。

これらサイトカイン・ケモカインを産生するのは細胞表面に CD4 を発現しているヘルパーT 細胞 (以下、CD4+Th 細胞と表記する) である。実際に、気管支喘息患者の気道炎症局所にはヘルパーT 細胞の浸潤が顕著に見られること、そのうちのかかなりの T 細胞は活性化していること、喘息の重症度または気道過敏性の程度と活性化 T 細胞数とが相関すること、さらに喘息患者の末梢血中にも活性化 T 細胞が増加していることなどが明らかにされている (Am. Rev. Respir. Dis., 145, S22 (1992))。

ヘルパーT 細胞は、産生されるサイトカインによって Th1 細胞と Th2 細胞に分類される (Annu. Rev. Immunol., 7, 145 (1989))。Th2 細胞は、IL-4、IL-5 および IL-13 などを産生する。Th2 細胞が産生するサイトカインを Th2 サイトカインと称する。

アトピー性疾患患者より分離した抗原特異的 T 細胞クローンは、インビトロ (*in vitro*) で刺激すると Th2 サイトカインを放出する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4538 (1991))。また、喘息患者の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid : 以下 BAL と表記する) や気道粘膜には Th2 細胞が存在する (N. Engl. J. Med., 326, 298 (1992)、Eur. J. Immunol., 23, 1445 (1993))。アレルギー性炎症動物モデルでの BAL 中細胞の種々のサイトカインの mRNA 発現を調べると、Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 の

mRNA の発現が上昇している (Clin. Immunol. Immunopathol., 75, 75 (1995))。さらに、マウス静脈内および鼻腔内に Th2 細胞を投与した場合、肺に抗原特異的な喘息様炎症症状が誘導され (J. Exp. Med, 186, 1737 (1997)、J. Immunol, 160, 1378 (1998))、好酸球増多症を引き起こす (J. Immunol, 161, 3128 (1998))。喘息患者の気道粘膜組織、アトピー性皮膚炎患者の病変部においては IL-5 の発現が認められ (J. Clin. Invest., 87, 1541 (1991)、J. Exp. Med., 173, 775 (1991))、通年性鼻アレルギー患者粘膜の IL-5 の発現量は、IL-13 の発現量、血清総 IgE 値および抗原特異的 IgE 値とよく相関する (治療学, 32, 19 (1998))。

ケモカインとは、生体内で産生される白血球遊走・活性化作用を有する塩基性のヘパリン結合性蛋白質の総称であり、それらは一次構造上よく保存されたシステイン残基の位置によって、CXC、CC、C、および CX<sub>3</sub>C のサブファミリーに分類される。現在までに 16 種類のケモカイン受容体が同定されており (Curr. Opi. Immunol., 11, 626 (1999))、また、各種ケモカイン受容体は、Th1 細胞、Th2 細胞などの白血球により発現が異なる (細胞工学, 17, 1022 (1998))。

ヒト CCR4 は、ヒト未熟好塩基球細胞株 KU-812 から K5-5 としてクローニングされた G 蛋白共役型の 7 回膜貫通型受容体である (J. Biol. Chem., 270, 19495 (1995)、W096/23068)。CCR4 の膜貫通領域はアミノ酸配列 40～67 番目、78～97 番目、113～133 番目、151～175 番目、207～226 番目、243～270 番目、285～308 番目、細胞外領域はアミノ酸配列 1～39 番目、98～112 番目、176～206 番目、271～284 番目、細胞内領域はアミノ酸配列 68～77 番目、134～150 番目、227～242 番目、309～360 番目であると推定されている。クローニング当時は CCR4 のリガンドが MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ )、RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted)、もしくは MCP-1 (monocyte chemotactic protein) であると報告されていた (Biochem. Biophys. Res. Commun., 218, 337 (1996)、W096/23068)。しかし、その後刺激したヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells) や



胸腺細胞から産生される TARC (thymus and activation - regulated chemokine) (J. Biol. Chem., 271, 21514 (1996)) が CCR4 に特異的に結合することが判明した (J. Biol. Chem., 272, 15036 (1997))。さらにマクロファージから単離された MDC (macrophage-derived chemokine) (J. Exp. Med., 185, 1595 (1997))、別名 STCP-1 (stimulated T cell chemotactic protein-1 (J. Biol. Chem., 272, 25229 (1997)) が TARC よりも強く CCR4 に結合することも報告されている (J. Biol. Chem., 273, 1764 (1998))。

CCR4 は、サイトカイン・ケモカイン産生能を持つ CD4+Th 細胞に発現していることが示され (J. Biol. Chem., 272, 15036 (1997))、さらに CD4+Th 細胞の中でも Th2 細胞に選択的に発現していることが報告された (J. Exp. Med., 187, 129 (1998)、J. Immunol., 161, 5111 (1998))。さらに、エフェクター/メモリーT細胞 (CD4+/CD45RO+) 集団中に CCR4+細胞が確認され、CCR4+細胞を刺激すると IL-4、IL-5 を産生するが IFN- $\gamma$ は産生されない (Int. Immunol., 11, 81 (1999))。またメモリーT細胞中の CLA (cutaneous lymphocyte antigen) 陽性、 $\alpha 4\beta 8$  インテグリン陰性集団に CCR4+細胞が属しており、CCR4 は腸管免疫ではなく、皮膚などの全身性免疫に関わるメモリーT細胞に発現していることが報告されている (Nature, 400, 776 (1999))。以上のことから、炎症が誘発された場合にメモリーT細胞は活性化されて CCR4 を発現し、CCR4 のリガンドである MDC または TARC によってメモリーT細胞が炎症局所に遊走して、他の炎症性細胞を活性化する可能性が強く示唆される。

最近になって、ヒトではナチュラルキラー細胞 (Journal of Immunology, 164, 4048-4054 (2000)、Blood, 97, 367-375 (2001)) や血小板 (Thrombosis Research, 101, 279-289 (2001)、Blood, 96, 4046-4054 (2000)、Blood, 97, 937-945 (2001)) にも CCR4 が発現されていることが明らかになった。

CCR4 のリガンドである TARC または MDC の拮抗剤、すなわち CCR4 アンタゴニストは、血小板凝集を阻害することが知られている (W099/15666)。このよう

に CCR4 の機能に影響を与える薬剤は、血小板機能に対しても影響を及ぼすことが、知られている。

血小板には CCR4 の発現が認められる。例えば、Adrian ら (Blood, 97, 937-945 (2001))、Abi-Younes ら (Thrombosis Research, 101, 279-289 (2001)、W000/42074、W000/41724) はいずれもヒト血小板での CCR4 の発現を抗 CCR4 抗体により検出している。これまでに CCR4 に反応性を有するが、ヒト血小板に結合しない抗体はこれまで知られていない。

また、血小板に結合する自己抗体が出現すると、自己免疫性血小板減少症を引き起こすことが知られている (Blood, 70, 428-431 (1987)、Transfusion Science, 19, 245-251 (1998))。血小板減少や血小板機能に影響を与える薬剤は、出血、血栓形成など重篤な副作用を発現し易く、一般的には医薬品としては好ましくない。特に、抗体は血中半減期が長いことから、血小板機能に影響を与える性質を有する抗体は、医薬品として開発することは困難である。例えば、自己免疫疾患治療薬として開発されていた抗 CD40 リガンド抗体は、活性化血小板上に発現している抗原を認識することに起因すると思われる副作用の出現により開発が中断されている (Nature Medicine, 6, 114 (2000)、BioCentury, A8 of 18 (2002.06.20))。

タンパク質は、翻訳後様々な修飾反応を受けることが知られている。修飾反応の一つにチロシン残基の硫酸化反応が知られている。今まで多くのタンパク質がチロシン残基の硫酸化を受けることが報告されている (Chemistry and Biology, 7, R57-R61 (2000))。硫酸化を受けるチロシン残基に関しては、近傍に酸性アミノ酸残基が多いことが特徴とされ、硫酸化を受ける可能性のあるタンパク質とその部位に関して示唆もされている (Cell, 96, 667-676 (1999))。CCR4 に関しても、N 末端近くに 4 残基のチロシン残基が存在するが、これらのチロシン残基が硫酸化を受けるという報告はされていない。

現在の Th2 介在性免疫疾患に対する治療法としては、①サイトカイン・ケモカインに対する拮抗剤、例えば、ヒト化抗 IL-5 抗体 (SB-240563 : スミス・

クラインビーチャム社、Sch-55700 (CDP-835) : シェーリング・プラウ/セルテック社)、ヒト化抗 IL-4 抗体 (US Patent No. 5,914,110)、可溶性ケモカイン受容体 (J. Immunol., 160, 624 (1998)) など、②サイトカイン・ケモカイン産生抑制剤、例えば、IL-5 産生阻害剤 (特開平 8-53355)、レチノイドアンタゴニスト (W099/24024)、トシル酸スプラタスト (IPD-1151T、大鵬薬品工業社製) など、③好酸球や肥満細胞などの最終的な炎症性細胞を対象としたもの、例えば、ヒト化抗 IL-5 受容体抗体 (W097/10354)、CC ケモカイン受容体 3 (CCR3) 拮抗剤 (特開平 11-147872) など、④炎症性生体機能分子阻害剤、例えば、ヒト化抗 IgE 抗体 (Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157, 1429 (1998)) など、が開発されているが、これらは複雑なサイトカイン・ケモカイン・炎症性細胞間のネットワークの一部を阻害するだけであり、根治的ではない。T 細胞を制御するものとしては抗 CD4 抗体があり、重度のステロイド依存性喘息に効果をあげている。しかし CD4 分子は免疫担当細胞に広く発現しているため、特異性に欠け、強い免疫抑制作用を伴うという欠点を有する (Int. Arch. Aller. Immunol., 118, 133 (1999))。

このことから、これらすべてを抑制するためには、アレルギー反応の上流部、すなわち Th2 細胞の制御が必要となる。

現在の重度の Th2 介在性免疫疾患患者に対する主な治療法はステロイド投与であるが、ステロイドによる副作用を免れることは出来ない。また、ステロイド投与を中止した場合には、患者の病態はまた元に戻り、長期間のステロイド投与は耐性を獲得するなどの欠点を有する。

これまで、CCR4 を発現している細胞を検出でき、かつ、CCR4 発現細胞に対して細胞障害活性を有するヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片は確立されていない。さらに、Th2 サイトカインの産生を抑制するヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片はこれまでに知られていない。

白血病患者においても腫瘍細胞に CCR4 が発現している例があることが報告されているが (Blood, 96, 685 (2000))、それら CCR4 を発現している白血病

細胞を障害し、治療効果を有するようなヒト型 CDR 移植抗体及びその抗体断片はこれまでに報告されていない。

一般にヒト以外の動物の抗体、例えばマウス抗体などをヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体 (Human Anti Mouse Antibody : HAMA) が誘導されることが知られている。HAMA は投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり (J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984)、Blood, 65, 1349 (1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242 (1985))、マウス抗体の体内からの消失を速め (J. Nucl. Med., 26, 1011 (1985)、Blood, 65, 1349 (1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 937 (1988))、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている (J. Immunol., 135, 1530 (1985)、Cancer Res., 46, 6489 (1986))。

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物の抗体をヒト型 CDR 移植抗体にすることが試みられている。

ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体の可変領域 (以下、V 領域と表記する) 中の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である (Nature, 321, 522 (1986))。このようなヒト型 CDR 移植は、マウス抗体などのヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が延長したことが報告されている (Cancer Res., 56, 1118, 1996、Immunol., 85, 668 (1995))。すなわち、ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒトにおいて副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。

また、ヒト型 CDR 移植抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、ヒト抗体の重鎖 (以下、H 鎖と表記する) 定常領域 (以下、C 領域と表記する) (H 鎖 C 領域を、CH と表記する) として  $\gamma 1$  サブクラスを使用すれば、抗体依存性細胞障害 (以下、

ADCC と表記する) 活性などのエフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができ (Cancer Res., 56, 1118 (1996))、かつ、マウス抗体に比べ血中半減期の延長が期待される (Immunol., 85, 668 (1995))。特に CCR4 発現細胞数を減少させる治療においては、抗体の Fc 領域 (抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域) を介した補体依存性細胞障害活性 (以下、CDC 活性と表記する) や ADCC 活性等の細胞障害活性の高さがその治療効果に重要であるために、ヒト型 CDR 移植抗体のほうがマウス抗体等のヒト以外の動物の抗体より望ましいことを明確に示している。

さらに、ヒト型 CDR 移植抗体は、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体 (以下、scFv と表記する) (Science, 242, 423 (1988))、2 量体化 V 領域断片 (以下、Diabody と表記する) (Nature Biotechnol., 15, 629 (1997))、ジスルフィド安定化 V 領域断片 (以下、dsFv と表記する) (Molecular Immunol., 32, 249 (1995))、CDR を含むペプチド (J. Biol. Chem., 271, 2966 (1996)) などの、分子量の小さい抗体断片としても作製でき、これらの抗体断片は、完全な抗体分子に比べ、標的組織への移行性に優れている (Cancer Res., 52, 3402 (1992))。

以上の事実は、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、マウス抗体などのヒト以外の動物の抗体よりもヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片の方が望ましいことを示している。

これまで述べてきたように、ヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片は、単独の使用によっても診断およびその治療の効果が期待されるが、更に他の分子との併用により、それらの効果をより高めることが検討されている。例えば、該他の分子の一つとしてサイトカインが用いられている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。抗体の細胞障害活性には、CDC 活性や ADCC 活性等が知られているが、ADCC 活性は単核球、マクロファージ、NK 細胞のような Fc 受容体を細胞表面に有するエフェクター細胞によって担われている (J. Immunol., 138, 1992 (1987))。種々のサイト

カインはこれらのエフェクター細胞を活性化することから、抗体の ADCC 活性を高める目的で、抗体と組み合わせて投与することが行われている。

#### 発明の開示

本発明は、以下の (1)～(59) に関する。

- (1) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、ヒト血小板に反応性を示さないヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
- (2) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示すヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
- (3) CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示す上記 (1) 記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
- (4) 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 1～39、98～112、176～206 および 271～284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である上記 (1)～(3) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
- (5) 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 2～29 番目に存在するエピトープである上記 (1)～(4) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
- (6) 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 13～29 番目に存在するエピトープである上記 (1)～(5) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
- (7) 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目に存在するエピトープである上記 (1)～(6) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
- (8) CCR4 発現細胞に特異的に反応する上記 (1)～(7) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(9) CCR4 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞障害活性を示す上記 (1)～(8) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(10) 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性である上記 (2)～(9) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(11) ADCC 活性が CCR4 発現細胞の細胞死を誘導することによるものである上記 (10) 記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(12) CCR4 発現細胞を除去する作用を示す抗体である上記 (1)～(11) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(13) CCR4 発現細胞が Th2 細胞である上記 (8)～(12) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(14) Th2 細胞が産生するサイトカイン産生を抑制する活性を示す上記 (1)～(13) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(15) サイトカインが、IL-4、IL-5、または IL-13 である上記 (14) 記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(16) ヒト抗体 IgG 型に属する上記 (1)～(15) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(17) CCR4 に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、上記 (1)～(16) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(18) CCR4 に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、上記 (1)～(17) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(19) CCR4 に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体の H 鎖定常領

域（C 領域）および L 鎖 C 領域を含む、上記（1）～（18）のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

（20） それぞれ配列番号 1、2、3 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3 を含む、上記（1）～（19）のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

（21） それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（L 鎖）可変領域（V 領域）の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3 を含む、上記（1）～（20）のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

（22） それぞれ配列番号 1、2、3 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（L 鎖）V 領域の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3 を含む、上記（1）～（21）のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

（23） 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、上記（1）～（22）のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

（24） 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 38 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala のうち少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、上記（1）～（22）のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

（25） 抗体の軽鎖（L 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目 Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸



配列を含む、上記 (1)～(24) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(26) 抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala、ならびに抗体の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、上記 (1)～(23) および (25) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(27) 抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 38 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala、ならびに抗体の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、上記 (1)～(22)、(24) および (25) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(28) 抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 4、9、10、11、38、39、40 および 41 から選ばれるアミノ酸配列を含む、上記 (1)～(22) および (25) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(29) 抗体の軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 8、12、13 および 14 から選ばれるアミノ酸配列を含む上記 (1)～(24) および (28) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(30) 抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 4、9、10、11、38、39、40 および 41 から選ばれるアミノ酸配列、ならびに抗体の軽鎖 (L 鎖) V 領域が、配列番号 8、12、13 および 14 から選ばれるアミノ酸配列を含む上記 (1)～(22) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(31) 抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 9 または 10 で示されるアミノ酸配列、および抗体の軽鎖 (L 鎖) V 領域が配列番号 14 で示されるアミノ酸配列を含む上記 (1)～(22) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(32) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1 本鎖抗体 (scFv)、2 量体化可変領域 (V 領域) 断片 (Diabody)、ジスルフィド安定化 V 領域断片 (dsFv) および相補性決定領域 (CDR) を含むペプチドから選ばれる抗体断片である上記 (1)～(31) のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

(33) 形質転換株 KM8759 (FERM BP-8129) または KM8760 (FERM BP-8130) が生産するヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(34) 上記 (1)～(33) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片を生産する形質転換株。

(35) 形質転換株が、KM8759 (FERM BP-8129) または KM8760 (FERM BP-8130) である上記 (34) 記載の形質転換株。

(36) 上記 (34) または (35) 記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記 (1)～(33) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とするヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片を生産する形質転換株の製造方法。

(37) 上記 (1)～(33) のいずれか 1 項に記載されたヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合しているヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

(38) 上記 (1)～(33) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片をコードする DNA。

(39) 上記 (38) 記載の DNA を含有する組換えベクター。

(40) 上記 (39) 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(41) 上記 (1)～(37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する医薬。

(42) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する CCR4 関連疾患の治療薬。

(43) CCR4 関連疾患が癌または炎症性疾患である上記 (42) 記載の治療薬。

(44) 癌が血液癌である上記 (43) 記載の治療薬。

(45) 血液癌が白血病またはリンパ腫である上記 (44) 記載の治療薬。

(46) 炎症性疾患が、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (43) 記載の治療薬。

(47) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する CCR4 関連疾患の診断薬。

(48) CCR4 関連疾患が癌または炎症性疾患である上記 (47) 記載の診断薬。

(49) 癌が血液癌である上記 (48) 記載の診断薬。

(50) 血液癌が白血病またはリンパ腫である上記 (48) 記載の診断薬。

(51) 炎症性疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (48) 記載の診断薬。

(52) 上記 (1)～(37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する Th2 介在性免疫疾患の治療薬。

(53) Th2 介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (52) 記載の治療薬。

(54) 上記 (1)～(37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する Th2 介在性免疫疾患の診断薬。

(55) Th2 介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (54) 記載の診断薬。

(56) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4 を免疫学的に検出する方法。

(57) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

(58) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を減少または除去する方法。

(59) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、Th2 細胞が産生するサイトカインを抑制する方法。

本発明における CCR4 関連疾患としては、癌、炎症性疾患などを包含する。

本発明における癌としては、血液癌、特に白血病、リンパ腫などを包含する。

本発明における炎症性疾患としては、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などを包含する。

本発明における Th2 介在性免疫疾患としては、Th2 細胞を介在する免疫疾患であればいずれでもよいが、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症、間質性肺炎、肺繊維症、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患を包含する。

本発明における CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体（抗 CCR4CDR 移植抗体）およびその抗体断片（以下、両者を総称して本発明の抗体と表記することもある）は、ヒト CCR4 の細胞外領域に特異的に反応し、ヒト血小板に

反応性を有さないヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片であればいかなるものでもよい。ヒト血小板に反応性を示さないとは、抗体がヒト血小板と実質的に結合性を示さないことをいい、具体的には、フローサイトメーターによる測定で結合性を示さないことをいう。

また、本発明の抗体は、ヒト CCR4 の細胞外領域に特異的に反応し、CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示す抗体である。

細胞障害活性としては、CDC 活性、ADCC 活性があげられる。

また、本発明の抗体として、好ましくは、配列番号 48 に示されるアミノ酸配列の 1～39、98～112、176～206 または 271～284 番目を含む領域、より好ましくは配列番号 48 に示されるアミノ酸配列の 2～29 番目（配列番号 36）、さらに好ましくは配列番号 48 に示されるアミノ酸配列の 12～29 番目（配列番号 37）、特に好ましくは配列番号 48 に示されるアミノ酸配列の 12～25 番目に、特異的に反応する抗体があげられる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体は、CCR4 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を任意のヒト抗体の VH および VL の FR に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH および H 鎖 C 領域（以下、CL と表記する）をコードする DNA を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列を選択方法としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank などのデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、またはヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991）などがあげられる。

本発明の抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、さらに hIgG クラスに属する  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$  といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいずれのものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものを用いることができる。

本発明の抗体としては、それぞれ配列番号 1、2、3 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR1、CDR2、CDR3 および／またはそれぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3 を含むヒト型 CDR 移植抗体または該抗体断片などがあげられる。

好ましくは、抗体の VH が配列番号 4 または 38、および／または VL が配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

より好ましくは、

抗体の VH が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VH が、配列番号 38 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala のうち少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VL が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VH が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala、ならびに抗体の VL が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる

少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VH が、配列番号 38 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala、ならびに抗体の VL が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体、などがあげられる。

これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述した性質を有する CCR4 と特異的に反応する抗体または抗体断片も本発明の範囲に包含される。

本発明のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ 1 もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1 または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてもよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、 $\epsilon$ -ブチルグリシン、 $\epsilon$ -ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Diabody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合（S-S結合）で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFabは、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体を蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

F(ab')<sub>2</sub>は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のF(ab')<sub>2</sub>は、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはS-S結合させ、作製することができる。

Fab'は、上記F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。



本発明の Fab' は、本発明の CCR4 に特異的に反応する  $F(ab')_2$  を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体の Fab' をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを 12 残基以上の適当なペプチドリンカー (P) を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の scFv は、本発明の CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

Diabody は、抗原結合特異性の同じまたは異なる scFv が 2 量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する 2 価の抗原結合活性または異なる抗原に対する 2 特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Diabody は、例えば、CCR4 に特異的に反応する 2 価の Diabody は、本発明の CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、3~10 残基のポリペプチドリンカーを有する scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより Diabody を発現させ、製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間の S-S 結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明の dsFv は、本発明の CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

本発明の CDR を含むペプチドは、本発明の CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL の CDR をコードする cDNA を構築し、該 cDNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体は、本発明の抗体に放射性同位元素、蛋白質または薬剤などを化学的にあるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の抗体の誘導体は、本発明の CCR4 に特異的に反応する抗体または抗体断片の H 鎖或いは L 鎖の N 末端側或いは C 末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは薬剤などを化学的手法（抗体工学入門、金光修著、（株）地人書館（1994））により結合させることにより製造することができる。

または、本発明の CCR4 に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードする DNA と、結合させたい蛋白質をコードする DNA を連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

放射性同位元素としては、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$  等があげられ、例えば、クロラミン T 法等により、抗体に結合させることができる。

薬剤としては、低分子のものが好ましく、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン C、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社（1996））、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（1982））などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン 2（以下、hIL-2 と表記する）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、hGM-CSF と表記する）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、hM-CSF と表記する）、ヒトインターロイキン 12（以下、hIL-12 と表記する）等があげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させ、融合抗体をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あ

るいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

以下に、本発明の CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片の作製方法、活性評価方法およびそれらの使用方法について説明する。

## 1. ヒト型 CDR 移植抗体の作製

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の CH および CL をコードする DNA が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする DNA をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域は任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の $\gamma 1$  サブクラスの CH および $\kappa$ クラスの CL などがあげられる。ヒト抗体の CH および CL をコードする DNA としてはエキソンとイントロンからなる染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 (Cytotechnol., 3, 133 (1990))、pAGE103 (J. Biochem., 101, 1307 (1987))、pHSG274 (Gene, 27, 223 (1984))、pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78, 1527 (1981))、pSG1 $\beta$ d2-4 (Cytotechnol., 4, 173 (1990))、pSE1UK1Sed1-3 (Cytotechnol., 13, 79 (1993)) などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーター (J. Biochem., 101, 1307 (1987))、モロニー Maus 白血病ウイルスの LTR (Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987))、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター (Cell, 41, 479 (1985)) とエンハンサー (Cell, 33, 717 (1983)) などがあげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖および L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい（J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)）。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (W097/10354)、pEE18 (Hybridoma, 17, 559 (1998)) などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

## (2) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下の様にして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植するヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank などのデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられるが、それらの中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相溶性（少なくとも 60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を

抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) や目的のヒト以外の動物の抗体の塩基配列を考慮して塩基配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100～200 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから、VH、VL とも 4 本もしくは 6 本程度の合成 DNA を設計することが好ましい。また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 1 の (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 反応後、増幅産物を pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) などのプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

### (3) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のみをヒト抗体の VH および VL の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991))。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の VH および VL では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の VH および VL の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR のアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改

変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991))。ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析 (J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)) あるいはコンピューターモデリング (Protein Engineering, 7, 1501 (1994)) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討するなどの種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物について本項 1 の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

#### (4) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

本項 1 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする DNA の上流に、本項 1 の (2) および (3) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項 1 の (2) および (3) でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 1 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする DNA の上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングすることができる。

#### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト型 CDR 移植抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項 1 の (4) に記載のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト型 CDR 移植抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型 CDR 移植抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) が一般に用いられる (Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991))。COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法 (Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991))、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987))などがあげられる。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト型 CDR 移植抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法 (ELISA ; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988) 、 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) などにより測定できる。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体の安定発現

本項 1 の (4) に記載のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト型 CDR 移植抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3 ,133 (1990)) などがあげられる。

ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型 CDR 移植抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) が



欠損した CHO 細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980))、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (YB2/0 細胞 ; ATCC CRL1662) などがあげられる。

発現ベクターの導入後、ヒト型 CDR 移植抗体を安定に発現する形質転換株は、G418 sulfate (G418 ; SIGMA 社製) などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994))。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (FBS) などの各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト型 CDR 移植抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は ELISA などにより測定できる。また、形質転換株は、dhfr 増幅系などを利用してヒト型 CDR 移植抗体の発現量を上昇させることができる (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994))。

ヒト型 CDR 移植抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996))。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE ; Nature, 227, 680 (1970)) やウエスタンブロッティング法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988) 、 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) など測定することができる。

## 2. 抗体断片の作製

抗体断片は、本項 1 に記載のヒト化抗体を元に遺伝子工学的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、Diabody、dsFv、CDR を含むペプチドなどがあげられる。

### (1) Fab の作製

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテイン A 結合性を有する IgG サブクラスであれば、プロテイン A カラムに通すことで、IgG 分子や Fc 断片と分離し、均一な Fab として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition (1995))。プロテイン A 結合性を持たない IgG サブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fab は低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition (1995))。また、Fab は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、本項 1 の (2) および (3) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab 発現用ベクターにクローニングし、Fab 発現ベクターを作製することができる。Fab 発現用ベクターとしては、Fab 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pIT106 (Science, 240, 1041 (1988)) などがあげられる。Fab 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に Fab を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、培養上清中に活性を持った Fab が漏出する。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一な Fab を精製することがで

きる (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992))。

## (2) $F(ab')_2$ の作製

$F(ab')_2$  は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fab と同様の精製操作により、均一な  $F(ab')_2$  として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press (1995))。また、本項 2 の (3) に記載の Fab' を o-PDM やビスマレイミドヘキサン等のようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、DTNB で処理し、S-S 結合させる方法によっても作製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

## (3) Fab' の作製

Fab' は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することができる。例えば、本項 1 の (2) および (3) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab' 発現用ベクターにクローニングし、Fab' 発現ベクターを作製することができる。Fab' 発現用ベクターとしては、Fab' 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19 (Bio/Technology, 10, 163 (1992)) などがあげられる。Fab' 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に Fab' を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab' とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテイン G カラム等を用いることにより、均一な Fab' を精製す

ることができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

#### (4) scFv の作製

scFv は遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌を用いて作製することができる。例えば、本項 1 の (2) および (3) に記載の抗体の VH および VL をコードする DNA を、12 残基以上のアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカーをコードする DNA を介して連結し、scFv をコードする DNA を作製する。作製した DNA を scFv 発現用ベクターにクローニングし、scFv 発現ベクターを作製することができる。scFv 発現用ベクターとしては、scFv の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Pharmacia 社製)、Phfa (Hum. Antibody Hybridoma, 5, 48 (1994)) などがあげられる。scFv 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面に scFv がファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv 発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層に scFv を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある scFv とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィー等を用いることにより、均一な scFv を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

#### (5) Diabody の作製

Diabody は、上記の scFv を作製する際のポリペプチドリンカーを 3~10 残基程度にすることで、作製することができる。1 種類の抗体の VH および VL を用

いた場合には、2 価の Diabody を、2 種類の抗体の VH および VL を用いた場合は、2 特異性を有する Diabody を作製することができる (FEBS Letters, 453, 164 (1999)、Int. J. Cancer, 77, 763 (1998))。

#### (6) dsFv の作製

dsFv は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することができる。まず、本項 1 の (2) および (3) に記載の抗体の VH および VL をコードする DNA の適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換された DNA を作製する。作製した各 DNA を dsFv 発現用ベクターにクローニングし、VH および VL の発現ベクターを作製することができる。dsFv 発現用ベクターとしては、dsFv 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pULI9 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) などがあげられる。VH および VL の発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に VH および VL を生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層から VH および VL を得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある dsFv とすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、さらに精製することができる (Protein Engineering, 7, 697 (1994))。

#### (7) CDR を含むペプチドの作製

CDR を含むペプチドは、Fmoc 法あるいは tBoc 法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDR を含むペプチドをコードする DNA を作製し、作製した DNA を適当な発現用ベクターにクローニングし、CDR ペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、CDR を含むペプチドをコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (Invitrogen 社製)、pAX4a+ (Invitrogen 社製) などがあげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペ

リプラズマ層に CDR を含むペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層から CDR を含むペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、精製することができる (Protein Engineering, 7, 697 (1994))。

### 3. 本発明の抗体の活性並びに性質の評価

#### (1) 抗原に対する結合性の評価

本発明の抗体の抗原との結合性は免疫酵素抗体法 (ELISA 法)、蛍光抗体法 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993))、BIAcore™ 等を用いた表面プラズモン共鳴等により測定できる。具体的には、CCR4 の部分配列を有する合成ペプチドを作製し、これとウシ血清アルブミンなどのキャリアー蛋白質とを化学的に結合させたコンジュゲートを作製する。このコンジュゲートを ELISA プレートに固相化し、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定することにより、本発明の抗体の CCR4 結合活性を測定することができる。

#### (2) CCR4 発現細胞に対する反応性

CCR4 発現細胞に対する反応性を検討するためには、細胞表面に発現されている CCR4 を効率よく検出する方法を用いることが好ましい。方法としては、蛍光抗体法を用いたフローサイトメーター、グルタルアルデヒドなどによる検定などがあげられる。更に、血小板などの生体由来の細胞などとの反応性を検討する際には、出来る限り生体内に近い条件で検討を行うことが好ましい。これらの理由から、本発明の抗 CCR4 抗体の反応性を検討する際には、蛍光抗体法を用い、フローサイトメーターにより検討を行うことが最も好ましい。

蛍光抗体法に用いる抗体としては、FITC などの蛍光物質、ビオチンなどにより標識された抗体であっても、標識をされていない抗体であってもよい。用い

た抗体の標識の有無、その種類により、蛍光標識アビジン、蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン抗体などを使用する。反応性は、十分量の抗 CCR4 抗体（通常最終濃度が 0.1～10  $\mu$ g/ml）を検体に加えて行い、陰性対照抗体、陽性対照抗体の反応性との比較を行うことにより評価することができる。

### (3) 細胞障害活性

CCR4 発現細胞に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定し、評価する事が出来る（Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)）。産生サイトカイン量の変化はサイトカインに対する抗体を用いて、ELISA 法及び蛍光抗体法等により測定できる。

### (4) リガンド結合阻害活性

CCR4 に結合性を有するリガンドである TARC や MDC の標識体と CCR4 発現細胞あるいはその細胞膜画分を用いる事により、本発明の抗 CCR4 抗体のリガンド結合阻害活性を検討する事が出来る。TARC や MDC の標識には、検出可能なものであればどのような手法を用いても良く、例えば、蛍光標識、酵素標識、放射線標識などが挙げられる。具体的な手法としては、例えば W000/42074 に放射線標識体を用いる結合阻害活性の測定方法があげられる。

また、CCR4 へのリガンドの結合によって引き起こされる細胞応答を指標とし、本発明の抗 CCR4 抗体のリガンド結合阻害活性を検討する事が出来る。細胞応答としては、CCR4 発現細胞にリガンドを接触させる事により引き起こされるものであれば如何なるものでも良く、例えば細胞内カルシウム濃度の変化、細胞遊走などをあげることができる。具体的な手法としては、例えば、W000/42074 に CCR4 リガンドによって引き起こされる CCR4 発現細胞の遊走阻害を測定する方法があげられる。

#### (5) 認識配列の検討

本発明の抗体の認識するアミノ酸配列の決定は、対応する抗原タンパク質の一次配列に基づいて設計された合成ペプチドを用いることにより調べることが出来る。

合成ペプチドの一次配列は、抗原タンパク質の一次配列に基づいて設計される。合成ペプチドとキャリアー蛋白質とを架橋させたタンパク質を作製する為、合成ペプチドのカルボキシル末端あるいはアミノ末端にシステイン残基を付加することもできる。こうして作製されたタンパク質は、後述する ELISA に用いることが出来る。また、必要に応じ合成ペプチドの N 末端はアセチル化することもでき、C 末端はアミド化することもできる。

ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる (International Journal of Peptide Protein Research, 35, 161-214 (1990)、 「Solid-Phase Peptide Synthesis」, Methods in Enzymology, vol. 289、 Gregg B. Fields 編, Academic Press, (1997)、 「Peptide Synthesis Protocols」, Methods in Molecular Biology, vol. 35, Michael W. Pennington, Ben M. Dunn 編, Humana Press (1994))。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アドバンス・ケムテック社 (Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT 社と略称する) 製ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した  $N^{\alpha}$ -Fmoc-アミノ酸あるいは  $N^{\alpha}$ -Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学 (株)、ノババイオケム社 (NovaBiochem)、渡辺化学 (株)、ACT 社、アナスペック社 (AnaSpec Inc.)、またはペプチド研究所 (株) 等から入手することができる。



合成ペプチドを用いて、本発明の抗体の認識するアミノ酸配列を決定する方法としては、合成ペプチドと該抗体の結合を検出することが出来る方法であれば如何なる手法を用いることもできる。例えば、合成ペプチドを蛍光物質、放射性物質などで標識し、得られた標識ペプチドと抗体との結合性を調べることにより、抗体の認識するアミノ酸配列を決定することができる。あるいは、合成ペプチドをウシ血清アルブミン（BSA）などのタンパク質と架橋し、得られたタンパク質の抗体との反応性を ELISA 法などの方法により評価することにより行うこともできる。さらには、抗原タンパクなど、抗体が結合することが確認されている物質を用い、その物質に対する抗体の結合を阻害する合成ペプチドを調べることにより、本発明の抗体の認識するアミノ酸配列を決定することもできる。

#### 4. 本発明の抗体を用いた CCR4 の検出および定量法

本発明は、本発明の抗体を用いて、CCR4 または CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法に関する。

本発明の抗体を用いて、CCR4、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法（ELISA 法）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC 法、CSA 法等）、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチ ELISA 法（単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（1987）、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法、東京化学同人（1986））などがあげられる。

蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシシン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法（ELISA 法）とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（RIA）とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンタなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

サンドイッチ ELISA 法とは、本発明の抗体で、抗原認識部位の異なる 2 種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体はプレートに吸着させ、もう一方の抗体は FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識した抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

## 5. ヒト型 CDR 移植抗体または抗体断片の使用する方法

本発明の抗体は、培養細胞株に発現している CCR4 と特異的に結合し、かつ CDC 活性および ADCC 活性等の細胞障害活性を示すため、Th2 介在性免疫疾患等の CCR4 が関与する疾患の診断、治療において有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体やキメラ抗体に比べ、ほとんどがヒト抗体のアミノ酸配

列に由来するため、ヒト体内において高い効果を示し、かつ、免疫原性が低く、その効果が長期間に渡り持続することが期待される。

また、本発明の抗体を、被験者の細胞あるいは組織に投与することにより、Th2 等の CCR4 を発現している細胞が産生するサイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 等の産生を抑制することができる。

本発明に係る CCR4 を発現している細胞としては Th2 細胞などがあげられる。Th2 細胞としては、好ましくは、活性化 Th2 細胞またはメモリーTh2 細胞などがあげられる。具体的には、CD45RA<sup>-</sup>または CD45RO<sup>+</sup>および CD4<sup>+</sup>の性質を有する細胞があげられる。

本発明の抗体が有する細胞障害活性は、Th2 細胞等の CCR4 発現細胞に本発明の抗体が結合し、当該細胞にアポトーシスを誘導することなどにより生ずる。また、アポトーシスを誘導することにより当該細胞に障害を与え、除去することができる。

また、Th2 介在性免疫疾患、癌疾患等の CCR4 関連疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒト CCR4 陽性細胞を、上述した免疫学的に検出する方法があげられる。

また、本発明の抗体は、Th2 介在性免疫疾患、癌疾患等の CCR4 関連疾患、また異常な CCR4 発現細胞の増加・減少により病態が進行する疾患の診断薬として用いることができる。

さらに、本発明の抗体はその細胞障害活性によりヒト CCR4 発現細胞を減少もしくは除去できるため、本発明の抗体を用いる Th2 介在性免疫疾患、癌疾患等の CCR4 関連疾患の診断方法あるいは治療方法、本発明の抗体を有効成分とする、Th2 介在性免疫疾患、癌疾患等の CCR4 関連疾患の治療薬および予防薬が提供される。

Th2 介在性免疫疾患とは、軽度・重度に関わらず、急性あるいは慢性の気道過敏性や気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などの炎症性疾患、Th2 細胞から放出されるサイトカイ

ン・ケモカインによって増殖もしくは活性化し得る好酸球や肥満細胞などの炎症担当細胞、ならびに Th2 細胞から放出されるサイトカイン・ケモカインによって産生される IgE 等の生体機能分子に基づく疾患、また異常な Th2 細胞の変動により病態が進行する免疫疾患を示す。

本発明の抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は本発明の抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体または抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。本発明の抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり0.01mg/kg～20mg/kgである。

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミド pKM2160Ga10 の造成工程を示した図である。

第2図は、プラスミド pKM2160Ga11 の造成工程を示した図である。＊は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

第3図は、プラスミド pKM2160Ga13 の造成工程を示した図である。＊は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

第4図は、プラスミド pKM2160LV0 の造成工程を示した図である。

第5図は、プラスミド pKM2160LV1 の造成工程を示した図である。＊は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

第6図は、プラスミド pKANTEX2160LV0 およびプラスミド pKANTEX2160Ga10LV0 の造成工程を示した図である。

第 7 図は、各抗 CCR4CDR 移植抗体の発現ベクターを COS-7 細胞に一過性発現させ、得られた培養上清中の CCR4 部分ペプチドへの ELISA 法における反応性を示した図である。

第 8 図は、別の FR を用いて作製した各抗 CCR4CDR 移植抗体の発現ベクターを COS-7 細胞に一過性発現させ、得られた培養上清中の CCR4 部分ペプチドへの ELISA 法における反応性を示した図である。

第 9 図は、精製した抗 CCR4CDR 移植抗体の CCR4 部分ペプチドへの ELISA 法における反応性を示した図である。

第 10 図は、精製した抗 CCR4CDR 移植抗体の CCR4 高発現細胞 (CCR4/EL-4) に対する反応性を示した図である。

第 11 図は、精製した抗 CCR4CDR 移植抗体の CCR4 部分ペプチドに対する親和性を表面プラズモン共鳴センサーを用いて測定した図である。

第 12 図は、CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性による細胞傷害性を示した図である。

第 13 図は、ヒト PBMC からの IL-4、IL-13、IFN- $\gamma$  産生抑制効果を示した図である。

第 14 図は、ヒト血小板に対する各抗体の結合活性を示した図である。

第 15 図は、プラスミド pKM2160VH41 と pKM2160VL61 の造成工程を示した図である。

第 16 図は、プラスミド pKANTEX2160H の造成工程を示した図である。

第 17 図は、プラスミド pKANTEX2160 の造成工程を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

#### 実施例 1

CCR4 に対するヒト型 CDR 移植抗体の作製：

1. CCR4 に対するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA の設計

(1) CCR4 に対するヒト型 CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列の設計

まず、CCR4 に対するヒト型 CDR 移植抗体（抗 CCR4CDR 移植抗体）の VH のアミノ酸配列を以下の様にして設計した。参考例 1 で作製された抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 (Int. Immunol., 11, 81 (1999)) を使用し、配列番号 1、2、および 3 に示した VH の CDR1、2、および 3 のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体の VH の FR のアミノ酸配列を選択した。配列解析システムとして GCG Package (Genetics Computer Group 社製) を用いて、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベースを BLASTP 法 (Nucleic Acid Res., 25, 3389 (1997)) により KM2160 と相同性の高いヒト抗体を検索した。相同性スコアと実際のアミノ酸配列の相同性を比較したところ、SWISSPROT データベースアクセスナンバー P01781、Ig Heavy chain V-III region Gal (Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem., 354, 1505-1509 (1973); 以下、Gal と称す) が 82.5% を示し、最も相同性の高いヒト抗体であったため、この抗体の FR のアミノ酸配列を選択した。ただしデータベース上の Gal の FR のアミノ酸配列中には、アミノ酸残基が一義的に決定されていない部分（分泌型抗体の N 末端から 28 番目、30 番目）やヒト抗体の配列では出現頻度の低いアミノ酸残基（V 領域の最後の残基である Thr）が認められた。そこで、28 番目と 30 番目については、マウス抗体 KM2160 に見られる残基である Ile と Ser を選択し、V 領域の最後の Thr については、Ser へ置換した。これらのアミノ酸残基は、任意のヒト抗体の配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) においても高頻度に認められることから、ヒト抗体の配列から逸脱するものではない。

以上のようにして決定したヒト抗体の FR のアミノ酸配列の適切な位置に配列番号 1、2、および 3 に示した抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の VH の CDR1、2、および 3 のアミノ酸配列を移植し、配列番号 4 に記載の抗 CCR4CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 Gal0 を設計した。配列番号 4 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号 49 に示した。

また、カバットらによって分類された共通配列を基に抗 CCR4CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列を設計した。

カバットらは、既知の様々なヒト抗体の VH をそのアミノ酸配列の相同性から 3 種類のサブグループ (HSG I~III) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられる。そこで、活性の高い抗 CCR4CDR 移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体の VH の 3 種類のサブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列のうち、KM2160 の VH の FR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有する FR のアミノ酸配列を選択した。第 1 表には、ヒト抗体の VH の各サブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列と KM2160 の VH の FR のアミノ酸配列との間の相同性の検索結果を示した。第 1 表に示した様に、KM2160 の VH 領域の FR のアミノ酸配列はサブグループ III と最も高い相同性を有していた。

第 1 表		
HSGI	HSGII	HSGIII
57.47%	50.58%	77.01%

以上の結果から、ヒト抗体の VH のサブグループ III の共通配列の FR のアミノ酸配列の適切な位置に抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の VH の CDR のアミノ酸配列を移植し、配列番号 38 に記載の抗 CCR4CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 HV0 を設計した。配列番号 38 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号 57 に示した。

## (2) CCR4 に対するヒト型 CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列の設計

次に、抗 CCR4CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列を以下の様にして設計した。配列番号 5、6、および 7 に示した抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の VL の CDR1、2、



および 3 のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体の VL の FR のアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体の VL をそのアミノ酸配列の相同性から 4 種類のサブグループ (HSG I~IV) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)。そこで、ヒト抗体の VL の 4 種類のサブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列のうち、KM2160 の VL の FR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有する FR のアミノ酸配列を選択した。第 1 表には、ヒト抗体の VL の各サブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列と KM2160 の VL の FR のアミノ酸配列との間の相同性の検索結果を示した。第 1 表に示した様に、KM2160 の VL の FR のアミノ酸配列はサブグループ II と最も高い相同性を有していた。

第 2 表

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
65.00%	82.50%	65.00%	72.50%

以上の結果から、ヒト抗体の VL のサブグループ II の共通配列の FR のアミノ酸配列の適切な位置に配列番号 5、6、および 7 に示した抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の VL の CDR1、2、および 3 のアミノ酸配列を移植し、配列番号 8 に記載の抗 CCR4CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列 LV0 を設計した。配列番号 8 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号 53 に示した。

### (3) CCR4 に対するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL の改変

上記で設計した抗 CCR4CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 Ga10、HV0 および VL のアミノ酸配列 LV0 は、選択したヒト抗体の FR のアミノ酸配列に抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の CDR のアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般に、ヒト型 CDR 移植抗体では、マウス抗体の CDR のアミノ酸配列の移植のみでは活

性が低下してしまうことが多く、それを回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なっている FR のアミノ酸残基のうち、活性に影響を与えられとされるアミノ酸残基を CDR のアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本実施例においても、活性に影響を与えられとされる FR のアミノ酸残基を同定することを検討した。

まず、上記で設計した抗 CCR4CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 Ga10、HV0 および VL のアミノ酸配列 LV0 よりなる抗体 V 領域 (Ga10LV0 および HV0LV0) の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェア AbM (Oxford Molecular 社製) を、三次元構造の表示についてはソフトウェア Pro-Explore (Oxford Molecular 社製) あるいは RasMol (Glaxo 社製) を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の V 領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、Ga10LV0 または HV0LV0 の VH および VL の FR のアミノ酸配列において、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 と異なっている残基について順次、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の相当する位置に見られる残基へ改変したアミノ酸配列からなる三次元構造モデルを同様にして構築し、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160、Ga10LV0 または HV0LV0 および改変体の V 領域の三次元構造を比較した。

その結果、Ga10LV0 または HV0LV0 の FR のアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えられとされる残基として、Ga10 では 40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala を、HV0 では、28 番目の Thr および 97 番目の Ala を、LV0 では、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val を選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも 1 つ以上をマウス抗体 KM2160 に見られるアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を設計した。

まず、VH については、例えば Gal10 の 97 番目の Ala を改変した配列番号 9 で示した Gal11、Gal10 の 42 番目の Gly、44 番目の Gly を改変した配列番号 10 で示した Gal12、Gal10 の 97 番目の Ala、42 番目の Gly、44 番目の Gly を改変した配列番号 11 に示した Gal13、HV0 の 28 番目の Thr を改変した配列番号 39 に示した HV1、HV0 の 97 番目の Ala を改変した配列番号 40 で示した HV2、および HV0 の 28 番の Thr、97 番目の Ala を改変した配列番号 41 で示した HV3 をそれぞれ設計した。さらに VL については、例えば 2 番目の Ile を改変した配列番号 12 に示した LV1、3 番目の Val を改変した配列番号 13 に示した LV2、2 番目の Ile および 3 番目の Val を改変した配列番号 14 に示した LV3 を設計した。配列番号 9～11、39～41 および 12～14 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を、それぞれ配列番号 50～52、58～60、54～56 に示した。

## 2. 抗 CCR4CDR 移植抗体の cDNA の構築

### (1) 抗 CCR4CDR 移植抗体の VH をコードする cDNA の構築

実施例 1 の 1 項 (1) で設計した抗 CCR4CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 Gal10 をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号 15 に記載の抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1 つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体 V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を設計し、更に 5' 末端と 3' 末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣り合う塩基配列は、その末端に

約 20 塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 16、17、18、19、20、および 21 の 6 本の合成オリゴヌクレオチドを合成した (GENSET 社製)。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が  $0.1\mu\text{M}$  となる様に  $0.2\text{mM}$  dNTPs、 $1\text{mM}$  塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに  $0.4\mu\text{M}$  M13 primer RV (宝酒造社製)、 $0.4\mu\text{M}$  M13 primer M3 (GENSET 社製) および 2.5 単位の KOD polymerase (TOYOBO 社製) を用いて、合計  $50\mu\text{l}$  とし、PCR 反応を行った。反応条件は  $94^{\circ}\text{C}$  30 秒間、 $55^{\circ}\text{C}$  30 秒間、 $74^{\circ}\text{C}$  60 秒間のサイクルを 30 サイクル、その後  $74^{\circ}\text{C}$  10 分間を 1 サイクルで行った。該反応液を QIA quick PCR purification kit (QIAGEN 社製) にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約  $0.47\text{kb}$  の ApaI-NotI 断片を回収した。

次に、プラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) の  $3\mu\text{g}$  を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約  $2.95\text{kb}$  の ApaI-NotI 断片を回収した。

次に、上記で得られた抗 CCR4CDR 移植抗体の VH の PCR 産物の ApaI-NotI 断片とプラスミド pBluescript II SK(-) の ApaI-NotI 断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems 社製) を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第 1 図に示したプラスミド pKM2160Gal0 を得た。プラスミド pKM2160Gal0 で形質転換された大腸菌株である Escherichia coli DH5 $\alpha$ /pKM2160Gal0 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁

目 1 番地 1 中央第 6) に平成 13 年 8 月 22 日付けで FERM BP-7709 として寄託されている。

次に、実施例 1 の 1 項 (3) で設計した FR のアミノ酸残基の改変は以下のように行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体 KM2160 で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

97 番目の Ala を Gly に改変する際には、本項で作製したプラスミド pKM2160Gal0 の 25ng を鋳型とし、配列番号 22 と 23 に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成 DNA (GENSET 社製) をプライマーとしてそれぞれ終濃度  $0.4\mu\text{M}$  となるように加え、2.5 単位の KOD plus polymerase (TOYOBO 社製) を用いて、添付の取扱説明書に従い、 $50\mu\text{l}$  の系でまず  $94^{\circ}\text{C}$  で 2 分間加熱した後、 $94^{\circ}\text{C}$  15 秒間、 $55^{\circ}\text{C}$  30 秒間、 $68^{\circ}\text{C}$  40 秒間の条件で 35 サイクルの PCR 反応を行った。該反応液を QIA quick PCR purification kit (QIAGEN 社製) にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。全量を 10 単位の制限酵素 PstI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた後、10 単位の制限酵素 DraIII (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.58kb の PstI-DraIII 断片を回収した。

次に、プラスミド pKM2160Gal0 の  $3\mu\text{g}$  を 10 単位の制限酵素 PstI (宝酒造社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた後、10 単位の制限酵素 DraIII (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 2.7kb の PstI-DraIII 断片を回収した。

次に、上記で得られた PCR 産物由来の PstI-DraIII 断片とプラスミド pKM2160Gal0 由来の PstI-DraIII 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems 社製) を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第 2 図に示したプ

ラスミド pKM2160Gal1 を得た。プラスミド pKM2160Gal1 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160Gal1 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に平成 13 年 8 月 22 日付けで FERM BP-7710 として寄託されている。

42 番目の Gly を Asp に、また 44 番目の Gly を Arg に改変する際には、PCR プライマーとしては配列番号 24 に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成 DNA (GENSET 社製) と M13 primer RV (宝酒造社製) をプライマーとする以外は、基本的には上記と同様の方法で実施し、pKM2160Gal2 を得た。プラスミド pKM2160Gal2 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160Gal2 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に平成 13 年 8 月 22 日付けで FERM BP-7711 として寄託されている。

また上記 3 残基全ての改変は、以下のようにして構築した。得られた pKM2160Gal1 と pKM2160Gal2 を各約 0.5  $\mu$ g 用いて、10 単位の NheI（宝酒造社製）で 37°C で 1 時間反応させた後、更に ScaI（宝酒造社製）で 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKM2160Gal1 由来の約 1.3kb の NheI-ScaI 断片と、pKM2160Gal2 由来の約 2.0kb の断片を回収した。得られた 2 種類の断片を DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2（Appliedbiosystems 社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第 3 図に示したプラスミド pKM2160Gal3 を得た。プラスミド pKM2160Gal3 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160Gal3 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に平成 13 年 8 月 22 日付けで FERM BP-7712 として寄託されている。

次に、実施例 1 の 1 項 (1) で設計した抗 CCR4CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 HV0 をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号 15 に記載の抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1 つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンをつなぎ、完全な抗体 V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を設計し、更に 5' 末端と 3' 末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 16、42、43、44、45、および 21 の 6 本の合成オリゴヌクレオチドを合成し (GENSET 社製)、本項に記載した pKM2160Gal0 と同様の方法で pKM2160HV0 を得た。プラスミド pKM2160HV0 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160HV0 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に平成 13 年 8 月 27 日付けで FERM BP-7718 として寄託されている。

28 番目の Thr を Ile に改変する際には、配列番号 42 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号 69 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、また配列番号 43 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号 46 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミド pKM2160HV0 の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有する pKM2160HV1 を得た。プラスミド pKM2160HV1 で

形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160HV1 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に平成 13 年 8 月 27 日付けで FERM BP-7719 として寄託されている。

28 番目の Thr を Ile に、および 97 番目の Ala を Gly に改変する際には、配列番号 42 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号 69 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、また配列番号 43 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号 46 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、また配列番号 45 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号 47 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミド pKM2160HV0 の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有する pKM2160HV3 を得た。プラスミド pKM2160HV3 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160HV3 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に平成 13 年 8 月 27 日付けで FERM BP-7721 として寄託されている。

97 番目の Ala を Gly に改変する際には、以下の様にして構築した。得られた pKM2160HV0 と pKM2160HV3 を各約 0.5  $\mu$ g 用いて、10 単位の NheI（宝酒造社製）で 37°C で 1 時間反応させた後、更に ScaI（宝酒造社製）で 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKM2160HV3 由来の約 1.3kb の NheI-ScaI 断片と、pKM2160HV0 由来の約 2.0kb の断片を回収した。得られた 2 種類の断片を DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2（Appliedbiosystems 社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有するプラスミド pKM2160HV2 を得た。プラスミ



ド pKM2160HV2 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160HV2 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に平成 13 年 8 月 27 日付けで FERM BP-7720 として寄託されている。

## (2) 抗 CCR4CDR 移植抗体の VL をコードする cDNA の構築

実施例 1 の 1 項 (2) で設計した抗 CCR4CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列 LV0 をコードする cDNA を VH と同様に PCR 法を用いて以下の様にして構築した。ただし、分泌シグナル配列としては、配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を有する抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の L 鎖の配列を用いた。

まず、配列番号 26、27、28、29、30 および 31 に記載の塩基配列を有する 6 本の合成オリゴヌクレオチドを合成した（GENSET 社製）。各オリゴヌクレオチドを最終濃度が 0.1  $\mu$ M となる様に 50  $\mu$ l の反応液に加えて、0.4  $\mu$ M M13 primer RV（宝酒造社製）、0.4  $\mu$ M M13 primer M4（宝酒造社製）もしくは配列番号 32 に示した M13 primer M3（GENSET 社製）、および 2.5 単位の KOD polymerase（TOYOBO 社製）を用いて、PCR 反応を行った。この際の反応条件は 94°C30 秒間、55°C30 秒間、74°C60 秒間のサイクルを 30 サイクル、その後 72°Cで 10 分間を 1 サイクルとした。該反応液を QIA quick PCR purification kit（QIAGEN 社製）にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。10 単位の制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）および 10 単位の制限酵素 XhoI（宝酒造社製）を用いて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.44kb の EcoRI-XhoI 断片を回収した。

次に、プラスミド pBluescript II SK(-)（Stratagene 社製）の 3  $\mu$ g を 15 単位の制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）および 15 単位の制限酵素 XhoI（宝酒造社製）を用いて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 2.95kb の EcoRI-XhoI 断片を回収した。

次に、上記で得られた抗 CCR4CDR 移植抗体の VL の PCR 産物の EcoRI-XhoI 断片とプラスミド pBluescript II SK(-)の EcoRI-XhoI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems 社製)を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第 4 図に示したプラスミド pKM2160LV0 を得た。プラスミド pKM2160LV0 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160LV0 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に平成 13 年 8 月 22 日付けで FERM BP-7713 として寄託されている。

次に、実施例 1 の 1 項 (3) で設計した FR のアミノ酸残基の改変は以下に示す方法で行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体 KM2160 で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

2 番目の Ile を Val に改変する際には、配列番号 27 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号 33 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミド pKM2160LV0 の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有する第 5 図に示したプラスミド pKM2160LV1 を得た。プラスミド pKM2160LV1 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160LV1 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に平成 13 年 8 月 22 日付けで FERM BP-7714 として寄託されている。

同様にして 3 番目の Val を Leu に改変する際には、配列番号 27 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号 34 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、また上記 2 残基をすべて改変する際には、配列番号 27 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番

号 35 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いることで目的のプラスミド pKM2160LV2、pKM2160LV3 をそれぞれ得た。プラスミド pKM2160LV2 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160LV2 およびプラスミド pKM2160LV3 で形質転換された大腸菌株である *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pKM2160LV3 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に平成 13 年 8 月 22 日付けで FERM BP-7715 および FERM BP-7716 としてそれぞれ寄託されている。

### (3) 抗 CCR4CDR 移植抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 (Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)) と実施例 1 の 2 項 (1) および (2) で得られたプラスミド pKM2160Gal10 および pKM2160LV0 を用いて抗 CCR4CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX2160Gal10LV0 を以下の様にして構築した。

実施例 1 の 2 項 (2) で得られたプラスミド pKM2160LV0 の 3  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて 55°C で 1 時間反応させた後、10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.44kb の BsiWI-EcoRI 断片を回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の 3  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて 55°C で 1 時間反応させた後、10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 12.75kb の BsiWI-EcoRI 断片を回収した。

次に、上記で得られた pKM2160LV0 由来 BsiWI-EcoRI 断片とプラスミド pKANTEX93 由来の BsiWI-EcoRI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られ

た組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第 6 図に示したプラスミド pKANTE $\text{X}$ 2160LV0 を得た。

次に、実施例 1 の 2 項 (1) で得られたプラスミド pKM2160Gal0 の 3  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 ApaI（宝酒造社製）を用いて 37°C で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 NotI（宝酒造社製）を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.47kb の ApaI-NotI 断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミド pKANTE $\text{X}$ 2160LV0 の 3  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 ApaI（宝酒造社製）を用いて 37°C で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 NotI（宝酒造社製）を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.45kb の ApaI-NotI 断片を回収した。

次に、上記で得られた pKM2160Gal0 由来の ApaI-NotI 断片とプラスミド pKANTE $\text{X}$ 2160LV0 由来の ApaI-NotI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）の Solution I を用いて、添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製した。

得られたプラスミドを用い、Big Dye Terminator Kit ver.2（Applied Biosystems 社製）を用いて塩基配列の解析を行った結果、目的の DNA がクローニングされている第 6 図に示した発現ベクター pKANTE $\text{X}$ 2160Gal0LV0 が得られたことを確認した。

また、HV0 を含め、その他 FR のアミノ酸残基に改変を加えた VH および VL についても同様の方法を用いて発現ベクターを作製した。

具体的には、実施例 1 の 2 項 (1) で作製した pKM2160Gal0、pKM2160Gal1、pKM2160Gal2、pKM2160Gal3、pKM2160HV0、pKM2160HV1、pKM2160HV2 および pKM2160HV3 と、実施例 1 の 2 項 (2) で作製した pKM2160LV0、pKM2160LV1、pKM2160LV2 および pKM2160LV3 とをそれぞれ組み合わせて以下の発現ベクターである pKM2160Gal0LV0、pKM2160Gal0LV1、pKM2160Gal0LV2、pKM2160Gal0LV3、

pKM2160Gal11LV1 、 pKM2160Gal11LV3 、 pKM2160Gal12LV1 、 pKM2160Gal12LV3 、  
 pKM2160Gal13LV1 、 pKM2160Gal13LV3 、 pKM2160HV0LV0 、 pKM2160HV0LV1 、  
 pKM2160HV0LV2 、 pKM2160HV0LV3 、 pKM2160HV1LV0 、 pKM2160HV1LV1 、  
 pKM2160HV1LV2 、 pKM2160HV1LV3 、 pKM2160HV2LV0 、 pKM2160HV2LV3 、  
 pKM2160HV3LV0 および pKM2160HV3LV3 の 22 種類の発現ベクターを作製した。

## 実施例 2 抗 CCR4CDR 移植抗体の動物細胞による発現

### 1. COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) を用いた抗 CCR4CDR 移植抗体の一過性発現

#### (1) COS-7 細胞での一過性発現

$1 \times 10^5$  細胞/ml の COS-7 細胞を 10% の FCS を含む DMEM 培地 (ギブコ社製) にて 6 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 2ml/ウェルずつ分注し、37°C で一晚培養した。OPTI-MEM 培地 (ギブコ社製) 100  $\mu$ l に対して Fu-GENE<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent (ロシュ社製) 3  $\mu$ l を加え、さらに実施例 1 の 2 項 (3) で得られた 22 種類の抗 CCR4CDR 移植抗体発現ベクター 1  $\mu$ g をそれぞれ加えて室温で 15 分間放置し、DNA-リポソーム複合体を形成させた。該反応液を前述した COS-7 細胞にそれぞれ滴下し、よく混合した後に 37°C で培養した。培養後、72 時間の時点で培養上清を回収し、培養上清中の抗 CCR4CDR 移植抗体の活性評価を行った。

#### (2) 抗 CCR4CDR 移植抗体のヒト CCR4 に対する反応性評価

得られた 22 種類の抗体の培養上清を以下の方法にて活性評価を行った。

参考例 2 で作製された形質転換体 KM2760 (FERM BP-7054) が生産する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 37) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10mg の BSA を含む PBS 溶液 900ml に、100ml の 25mg/ml SMCC (4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-

カルボキシリクアシッド N-ヒドロキシサクシニイミドエステル) (シグマ社製)-DMSO 溶液を vortex 下で滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25ml PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1ml をアプライし、1.5ml の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした ( $A_{280}$  測定から BSA 濃度を算出)。次に、0.5mg の化合物 1 に 250ml PBS を加え、次いで 250ml DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 1.25mg 分) を vortex 下で添加して 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4°C、一晚透析し、最終濃度 0.05% となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22mm フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液とした。

96 穴の EIA 用プレート (グライナー社) に、上述のように調製したコンジュゲートを  $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{l}$ /ウェルで分注し、4°C で一晚放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA を含む PBS (以下、1%BSA-PBS と表記する) を  $100 \mu\text{l}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05%Tween20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 6000 倍に希釈したペロオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ )抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 (2,2'-アジノービス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの 0.55g を 1 リットルの 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を  $1 \mu\text{l/ml}$  で添加した溶液) を  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5%SDS 溶液を  $50 \mu\text{l}$ /ウェル加えて反応を停止した。その後 415nm の吸光度を測定した。

また、培養上清中のヒト IgG 抗体の産生濃度を比較するためには抗原としてヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ )抗体 (American Qualex 社製) を PBS で 2000 倍希釈したものを使用した。

その結果を第 7 図と第 8 図に示した。各ヒト型 CCR4CDR 移植抗体はヒト型キメラ抗体 KM2760 とほぼ同等の活性を示した。

## 2. 抗 CCR4CDR 移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記実施例 1 の 2 項 (3) で得られた抗 CCR4CDR 移植抗体発現ベクターを用いて抗 CCR4CDR 移植抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

### (1) ラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) での安定発現

各ヒト型 CDR 移植抗体発現プラスミドを制限酵素 AatII (東洋紡績社製) で消化して直線状化した後、 $10\mu\text{g}$  を  $4\times 10^6$  細胞のラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) へエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990)) により導入後、40ml の H-SFM (GIBCO-BRL 社製) 培地 (牛胎児血清 (FBS) を 5% 添加) に懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に  $200\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~3 日間培養した後、G418 (ナカライテスク社製) を 1mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養し、G418 耐性の形質転換株を得た。

G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の抗原結合活性を実施例 2 の 1 項 (2) に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 1mg/ml、dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTX と表記する: Sigma 社製) を 50nM 含む H-SFM 培地に  $1\sim 2\times 10^5$  細胞/ml になる様に懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 1ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の抗原結合活性を実

施例 2 の 1 項 (2) に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 1mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む H-SFM 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体の発現の最も高い形質転換細胞クローンを得た。平成 14 年 7 月 30 日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に、発現ベクター pKANTEX2160Gal11LV3 を遺伝子導入して得た抗体生産細胞である KM8760 は FERM BP-8130 として、また発現ベクター pKANTEX2160Gal12LV3 を遺伝子導入して得た抗体生産細胞である KM8759 は FERM BP-8129 としてそれぞれ国際寄託されている。

## (2) 抗 CCR4CDR 移植抗体の培養上清からの精製

G418 耐性を示す形質転換株が出現し、コンフルエントになった時点で Daigo's GF21（和光純薬社製）を 5% の濃度で含む H-SFM 300～1100ml の H-SFM 培地に交換し、さらに 3～5 日間培養した。コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約 300～1100ml より Prosep-A（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4CDR 移植抗体を精製し、精製蛋白質を取得した。

## 3. 精製抗 CCR4CDR 移植抗体の活性評価

Gal10LV0、Gal10LV1、Gal10LV3、Gal11LV1、Gal11LV3、Gal12LV1、Gal12LV3、Gal13LV1 および Gal13LV3 の発現ベクターを YB2/0 へ導入して得られた抗体生産細胞由来の抗 CCR4CDR 移植抗体（以下、それぞれ単に Gal10LV0、Gal10LV1、Gal10LV3、Gal11LV1、Gal11LV3、Gal12LV1、Gal12LV3、Gal13LV1 および Gal13LV3 と称する）を用いて活性評価を行った。



(1) 抗 CCR4CDR 移植抗体のヒト CCR4 に対する結合活性の測定 (ELISA 法)

実施例 2 の 1 項 (2) に記載の方法と同様に行った。その結果を第 9 図に示した。どの抗 CCR4CDR 移植抗体もヒト型キメラ抗体 KM2760 とほぼ同程度の活性を示した。

(2) 抗 CCR4CDR 移植抗体のヒト CCR4 高発現細胞との反応性 (蛍光抗体法)

参考例 3 で得られた CCR4 高発現細胞である CCR4/EL-4 細胞を  $2 \times 10^5$  個以上、96 ウェルプレートに分注した。各精製抗体を FACS 用緩衝液 (1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%NaN<sub>3</sub>) にて  $10 \mu\text{g/ml}$  に、さらに非特異的な染色を防ぐためにヒトイムノグロブリン (ウェルファイド社製) を  $3.75\text{mg/ml}$  にそれぞれ希釈した抗体溶液を  $100 \mu\text{l}$ /ウェルとして加え、氷中で 30 分間反応させた。陰性対照としては、 $10 \mu\text{g/ml}$  の抗ヒト IL-5 受容体  $\alpha$  鎖抗体 (W097/10354) を用いた。FACS 用緩衝液にて  $200 \mu\text{l}$ /ウェルで 2 回洗浄後、PE 標識抗ヒト IgG 抗体 (コールター社製) を 100 倍希釈したものを  $50 \mu\text{l}$ /ウェル加えた。遮光し氷中で 30 分間反応後、FACS 用緩衝液  $200 \mu\text{l}$ /ウェルで 3 回洗浄した後、反応物を  $500 \mu\text{l}$  FACS 用緩衝液に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。その結果を第 10 図に示した。どの抗 CCR4CDR 移植抗体もヒト型キメラ抗体 KM2760 とほぼ同程度の活性を示した。

(3) 抗 CCR4CDR 移植抗体のヒト CCR4 に対する結合活性の測定 (BIAcore 法)

さらに詳細な結合活性を測定するために、精製した各種抗体の結合活性を BIAcore2000 (BIACORE 社製) を用いて以下のように測定した。なお、試料の希釈及び測定中の緩衝液としては HBS-EP (BIACORE 社製) を使用した。まずセンサーチップ SA (BIACORE 社製) にビオチン化した CCR4 部分ペプチドである化合物 1 の  $0.05 \mu\text{g/ml}$  の溶液  $5 \mu\text{l}$  を  $5 \mu\text{l}/\text{分}$  の流速で添加し、センサーチップに固定化した。

作製したビオチン化した化合物 1 の固定化センサーチップに、精製した抗体の  $4\mu\text{g/ml}$  の溶液の  $20\mu\text{l}$  を  $5\mu\text{l/分}$  の流速で添加し、添加終了後、4 分間にわたり解離反応をモニターした後、 $10\text{mM}$  の  $\text{HCl}$  の  $5\mu\text{l}$  を 2 回添加してセンサーチップ表面を再生した。こうして化合物 1 に対する結合反応曲線（センサーグラム）を得た。

その結果を第 11 図に示した。縦軸は、レゾナンス（共鳴）ユニット（RU）を表し、センサーチップ上の質量変化を意味する。例えば、 $1000\text{RU}$  は蛋白質の約  $1\text{ng/mm}^2$  の質量変化に相当する。KM2760 は、化合物 1 に対して時間依存的な結合活性を示し、その結合は、解離反応においてほとんど解離が認められないことから、極めて安定、かつ、高い結合活性を有することが示された。一方、各種抗 CCR4CDR 移植抗体は、ヒト型キメラ抗体 KM2760 とほぼ同程度の解離反応を示したが、CCR4 部分ペプチドである化合物 1 への結合反応において若干の活性低下が認められた。CDR のみを移植した抗 CCR4CDR 移植抗体 Ga10LV0 は、最も低い結合活性を示し、FR のアミノ酸残基の改変により、結合活性は上昇した。以上の結果は、マウス抗体 KM2160 の CDR を適切なヒト抗体の FR に移植することにより、マウス抗体の抗原結合活性および結合特異性を維持した抗 CCR4CDR 移植抗体を作製可能であること、さらに、抗体 V 領域の三次元構造等を基に結合活性に重要な FR のアミノ酸残基を同定し、それらを CDR とともに移植することで、より結合活性の高い抗 CCR4CDR 移植抗体を作製できることを示したものである。本実施例で作製した抗 CCR4CDR 移植抗体は、CCR4 に対する高い結合活性を有し、かつ、ヒトにおいてマウス抗体、さらには、ヒト型キメラ抗体よりも免疫原性が低下し、高い安全性と高い治療効果を示すことが期待される。

#### 4. 抗 CCR4CDR 移植抗体の *in vitro* 細胞障害活性（ADCC 活性）

上記実施例 2 の 2 項(2)で得られた精製抗 CCR4CDR 移植抗体の *in vitro* 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

### (1) 標的細胞溶液の調製

参考例 3 で得られたヒト CCR4 高発現細胞 CCR4/EL-4 を 0.5mg/ml の G418 を含む 10% の FCS を含む RPMI1640 培地 (GIBCO 社製) で培養し、 $1 \times 10^6$  細胞/0.5ml となる様に調製し、放射性物質であるクロム酸ナトリウム ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ) (第一化学薬品社製) を 1.85MBq 当量加えて 37℃ で 1.5 時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃ で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、10% の FCS を含む RPMI1640 培地を 5ml 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

### (2) エフェクター細胞溶液の調製

ヘパリンナトリウム注射液 (武田薬品社製) を 200 単位 ( $200 \mu\text{l}$ ) 入れた注射筒を用いて、健常人ヒト末梢血 60ml を採取した。その全量を等量の生理食塩液 (大塚製薬社製) にて 2 倍に希釈し、120ml とした。15ml 容量の遠心管 (住友ベークライト社製) 12 本にリンフォプレップ (NYCOMED 社製) を 5ml ずつ注し、その上から希釈した末梢血を 10ml ずつ重層し、 $800 \times g$ 、20 分間、室温で遠心分離した。血漿層とリンフォプレップ層の間にある PBMC 画分を全ての遠心管より採取して 1% の FCS を含む RPMI1640 培地 (以下 1%FCS-RPMI と称す) に懸濁し、 $400 \times g$ 、5 分間、4℃ で 2 回遠心洗浄して  $5 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞とした。

### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{l}$  ( $5 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 50:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CCR4CDR 移植抗体を

各最終濃度 0.1ng/ml～0.1 μg/ml となる様に加え、37℃で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を γ-カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は下式により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

その結果を第 12 図に示した。第 12 図に示した様に、抗 CCR4CDR 移植抗体は抗体濃度依存的に強い細胞傷害活性を示した。

#### 5. ヒト PBMC からのサイトカイン産生抑制効果

抗 CCR4CDR 移植抗体である Gal1LV3、キメラ抗体である KM2760 について、サイトカイン産生抑制効果を検討した。陰性対照として抗 IL-5R 抗体を用いた。

実施例 2、4 項(2)と同様にして PBMC を分離し、96 ウェル U 字底プレートに  $1 \times 10^6$  細胞/ウェルで分注し、さらに評価抗体を最終濃度 1 μg/ml となるように添加して、合計 200 μl/ウェルとした。37℃、5%CO<sub>2</sub> 気流下、24 時間共培養することで ADCC 活性を誘導した。培養後、上清を 100 μl 除去し、代わりに 100ng/ml の PMA (ホルボール・ミリステート・アセテート) と 2 μg/ml のイオノマイシン (SIGMA 社製) を含んだ培地 100 μl を加え、最終濃度を PMA が 50ng/ml、イオノマイシンが 1 μg/ml とし、細胞を刺激してサイトカイン産生を誘導させた。各刺激剤導入後、24 時間培養した後、培養上清を回収してサイトカイン測定キット (バイオソース社製) にて IL-4、IL-13、インターフェロン(IFN)-γ を測定した。産生抑制率は、抗体非添加の場合の各サイトカイン産

生量を、抑制率 0%として算出し、結果を第 13 図に示した。第 13 図に示すように、抗 CCR4CDR 移植抗体の Gal1LV3 抗体添加群では、キメラ抗体の KM2760 と同様に、著明に Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 の産生を抑制し、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  にはほぼ影響しなかった。

以上の結果は、各抗 CCR4CDR 移植抗体が効率よくヒトのエフェクター細胞を活性化して CCR4 を発現した Th2 細胞を減少もしくは除去でき、その結果 Th2 細胞からの Th2 サイトカイン産生抑制効果を惹起でき、気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのヒトの Th2 介在性免疫疾患の診断もしくは治療に有用であることを示している。

## 6. ヒト血小板に対する反応性の解析

### (1) ヒト血小板の分離

ヒト健常人より採取した血液に 3.2%クエン酸ナトリウムを 1/10 量添加し、よく混合した。該血液を 5ml ずつ 15ml チューブ（グライナー社製）に分注し、 $90\times g$ 、10 分間、室温で遠心分離を行った。上清を採取し、更に  $1950\times g$ 、10 分間、室温で遠心分離を行った。上清を除去し、ペレットを FACS 用緩衝液に懸濁した後、 $1190\times g$ 、5 分間、室温で遠心分離を行い、ペレットを洗浄した。再度 FACS 用緩衝液にて懸濁し、同様に遠心操作を行った後、FACS 用緩衝液にてペレット状の血小板を約  $1\times 10^7$  個/ml の濃度に調製した。

### (2) 血小板の染色

上記 6 項(1)で得られた血小板懸濁液  $100\mu l$  に、実施例 2 の 3 で得られた精製抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体をそれぞれ  $10\mu g/100\mu l$  になるように添加し、室温、暗所で 30 分間反応させた。比較対照として抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体である KM2760、抗 CCR4 マウス抗体である 1G1 抗体（Pharmingen 社製）をそれぞれ同濃度で血小板懸濁液  $100\mu l$  に反応させた。反応後、FACS 用緩衝液 2ml をそれぞれの  $15\mu l$  チューブへ添加し攪拌後、 $840\times g$ 、5 分間、 $4^{\circ}C$ で遠心分離を行

い、洗浄した。上清を除去後、再度同様の操作を行った。各ヒト型 CDR 移植抗体と KM2760 を反応させたサンプル入りチューブには、さらに FACS 用緩衝液で 50 倍に希釈した PE 標識抗ヒト IgG 抗体 (Coulter 社製) をそれぞれ  $20\mu\text{l}$  添加し、室温、暗所で 30 分間反応させた。1G1 抗体を反応させたサンプル入りチューブについては、さらに 50 倍希釈した PE 標識抗マウス IgG 抗体 (DAKO 社製) をも  $20\mu\text{l}$  添加し、室温、暗所で 30 分間反応させた。

反応後、FACS 用緩衝液をそれぞれ 2ml 添加して攪拌した後、 $840\times g$ 、5 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離し、洗浄した。上清を除去後、再度同様の操作を行った。FACS 用緩衝液で  $500\mu\text{l}$  に懸濁した後、フローサイトメーター EPICS XL-MCL (ベクマン・コールタ社製) で蛍光強度を測定した。

その結果を第 14 図に示した。比較対照である 1G1 抗体は血小板に反応性を示したが、いずれの抗 CCR4 ヒト型 CDR 移植抗体も抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体 KM2760 と同様、ヒト血小板に対して特異的な反応性を示さなかった。

#### 参考例 1

マウス抗 CCR4 モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞の作製：

以下の手順に従い、マウス抗 CCR4 モノクローナル抗体、KM2160 (Int. Immunol., 11, 81 (1999)) を産生するハイブリドーマ細胞を作製した。

##### (1) 抗原の調製

ヒト CCR4 (以下、hCCR4 と表記する) 蛋白質のアミノ酸配列 (配列番号 48) を Genetyx Mac を用いて解析し、親水性の高い部分、N 末端、C 末端のなかから抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物 2 (配列番号 36) を選択した。

## (2) 免疫原の調製

参考例 1 の (1) の hCCR4 部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で以下の方法で KLH (カルビオケム社) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLH を PBS に溶解して 10mg/ml に調整し、1/10 容量の 25mg/ml MBS (ナカライテスク社) を滴下して、30 分間攪拌反応させた。あらかじめ PBS で平衡化したセファデックス G-25 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの MBS を除いて得られた KLH-MB 2.5mg を 0.1M リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) に溶解したペプチド 1mg と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、PBS で透析した。

## (3) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

参考例 1 の (2) で調製したペプチド-KLH コンジュゲート 100  $\mu$ g をアルミニウムゲル 2mg および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製)  $1 \times 10^9$  細胞とともに 5 週令雌マウス (Balb/c) に投与し、2 週間後より 100  $\mu$ g のコンジュゲートを 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。最終投与後 3 日目のマウスより脾臓を摘出し、MEM 培地 (日水製薬社製) 中で裁断し、ピンセットを用いて解した後、遠心分離 (1200rpm、5 分間) して上清を除去後、3ml のトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で 1~2 分間処理し、赤血球を除いた。更に、MEM 培地で 3 回洗浄した後、細胞融合に供した。

## (4) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3X63Ag8U.1 (ATCC CRL1597) (以下、P3-U1 と表記する) を培養し、細胞融合における親株として用いた。

#### (5) ハイブリドーマ細胞の作製

参考例 1 の (3) および (4) で得られた脾細胞と骨髓腫細胞を 10 : 1 になる様に混合し、遠心分離 (1200rpm、5 分間) して上清を除去後、沈殿した細胞群に 37°C の条件下でポリエチレングリコール溶液 (2g のポリエチレングリコール-1000、2ml の MEM 培地および 0.7ml の DMSO からなる溶液) を  $10^8$  個の脾細胞あたり 0.5ml 加え、よく懸濁した。更に、1~2 分間毎に MEM 培地を 1~2ml ずつ数回加え、最終的に MEM 培地で全量を 50ml とした。遠心分離 (900rpm、5 分間) して上清を除去後、100ml の HAT 培地に懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に  $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注して 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、10~14 日間培養した。融合細胞の増殖が見られたウェルについて、培養上清中 hCCR4 部分ペプチド (化合物 2) に対する結合活性を ELISA 法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996) 等) により測定した。活性の認められたウェルについては、培地を HT 培地に変えて 1 回、更に、培地を正常培地に変えて 1 回、の計 2 回の限界希釈法によるクローン化を行った。この様にして、マウス抗体 KM2160 を生産するハイブリドーマ細胞 KM2160 を得た。KM2160 は hCCR4 部分ペプチド (化合物 2) に特異的に反応した。

#### 参考例 2

##### 抗 CCR4 キメラ抗体の作製

##### 1. 抗 CCR4 マウス抗体の V 領域をコードする cDNA の単離、解析 :

##### (1) 抗 CCR4 マウス抗体生産ハイブリドーマ細胞からの mRNA の調製

参考例 1 に記載されたハイブリドーマ細胞 KM2160 より mRNA を回収した。mRNA の調製キットである Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、ハイブリドーマ細胞 KM2160 の  $8 \times 10^7$  細胞より mRNA を約 48  $\mu\text{g}$  調製した。



### (2) 抗 CCR4 マウス抗体の H 鎖および L 鎖 cDNA ライブラリーの作製

参考例 2 の 1 項 (1) で取得した KM2160 の mRNA の  $5\mu\text{g}$  から、cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、両端に EcoRI-NotI アダプターを有する cDNA を合成した。作製した cDNA を  $20\mu\text{l}$  の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG 型抗体の H 鎖に対応する約 1.5kb の cDNA 断片と  $\kappa$  型の L 鎖に対応する約 1.0 kb の cDNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いてそれぞれ回収した。次に、 $\lambda$ ZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene 社製) を用いて、各々の約 1.5kb の cDNA 断片  $0.1\mu\text{g}$  および約 1.0kb の cDNA 断片  $0.1\mu\text{g}$  と、制限酵素 EcoRI で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase で末端を脱リン酸化した  $\lambda$ ZAPII ベクター  $1\mu\text{g}$  を、添付の使用説明書に従い、連結した。連結後の各々の反応液のうち  $2.5\mu\text{l}$  を GigapackIII Gold Packaging Extract (Stratagene 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、 $\lambda$ ファージにパッケージングした後、適当量を大腸菌株 XL1-Blue (Biotechniques, 5, 376 (1987)) に感染させて、KM2160 の H 鎖 cDNA ライブラリーとして  $9.3 \times 10^4$  個、L 鎖 cDNA ライブラリーとして  $7.4 \times 10^4$  個のファージクローンを取得した。次に各々のファージを、添付の使用説明書に従って、ナイロンメンブレンフィルター Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech 社製) 上に固定した。

### (3) 抗 CCR4 マウス抗体の H 鎖および L 鎖 cDNA のクローニング

参考例 2 の 1 項 (2) で作製した KM2160 の H 鎖 cDNA ライブラリーおよび L 鎖 cDNA ライブラリーのナイロンメンブレンフィルターを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体の C 領域の cDNA (H 鎖はマウス C $\gamma$ 1cDNA の BamHI-EcoRI 断片 (EMBO J., 3, 2047 (1984))、L 鎖はマウス

CkcDNA の HpaI-EcoRI 断片 (Cell, 22, 197 (1980)) をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンを H 鎖、L 鎖各 10 クローン取得した。次に、 $\lambda$ ZAPII Cloning Kit (Stratagene 社製) の使用説明書に従い、in vivo excision 法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれる cDNA の塩基配列を、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により解析した。その結果、cDNA の 5' 末端に開始コドンと推定される ATG 配列が存在する完全長の機能的な H 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM2160H4 および L 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM2160L6 を得た。

#### (4) 抗 CCR4 マウス抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

プラスミド pKM2160H4 に含まれていた H 鎖 V 領域の全塩基配列を配列番号 61 に、それから推定された H 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を配列番号 62 に、プラスミド pKM2160L6 に含まれていた L 鎖 V 領域の全塩基配列を配列番号 63 に、それから推定された L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を配列番号 64 にそれぞれ示す。既知のマウス抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)) との比較および精製した抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (島津製作所社製: PPSQ-10) を用いて解析した結果との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 をコードする完全長 cDNA であり、H 鎖については配列番号 15 に示したアミノ酸配列の 1 から 19 番目が、L 鎖については配列番号 25 に示したアミノ酸配列の 1 から 19 番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

次に、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖および L 鎖の V 領域のアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとして GCG Package (version 9.1, Genetics Computer Group 社製) を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列デ

データベースを BLASTP 法 (Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)) により検索した。その結果、H 鎖、L 鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖の V 領域の CDR1、CDR2 および CDR3 のアミノ酸配列を配列番号 1、2 および 3 に、L 鎖の V 領域の CDR1、CDR2 および CDR3 のアミノ酸配列を配列番号 5、6 および 7 にそれぞれ示した。

## 2. 抗 CCR4 キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

### (1) 抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 の構築

WO97/10354 に記載のヒト IgG1、 $\kappa$ 型の抗体を発現できるヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と参考例 2 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM2160H4 および pKM2160L6 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 を以下の様にして構築した。

KM2160 の H 鎖 V 領域 cDNA を PCR 法によって得るために配列番号 65 と 66 に示した塩基配列を有する合成 DNA を、L 鎖 V 領域 cDNA を得るために配列番号 67 と 68 に示した塩基配列を有する合成 DNA を設計した。それぞれの合成 DNA は 5' 末端に pKANTEX93 ヘクローニングするための制限酵素認識配列を含んでおり、DNA の合成はジェンセット社に委託した。参考例 2 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM2160H4 の 20ng を 50  $\mu$ l の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1 mM 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ M の配列番号 11 と 12 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94°C にて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、94°C にて 30 秒間、58°C にて 30 秒間、74°C にて 1 分間のサイクルを

25 サイクル行った。同様に、参考例 2 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM2160L6 の 20ng を 50  $\mu$ l の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ M の配列番号 67 と 68 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、上記の方法で PCR 反応を行なった。該反応液 10  $\mu$ l をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.46 kb の H 鎖 V 領域 PCR 産物、約 0.43 kb の L 鎖 V 領域 PCR 産物をそれぞれ回収した。

次に、プラスミド pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 SmaI (宝酒造社製) で消化して得られた DNA 0.1  $\mu$ g と、上記で得られたそれぞれの PCR 産物約 0.1  $\mu$ g を滅菌水に加えて 7.5  $\mu$ l とし、TAKARA DNA Ligation Kit Ver.2 の solution I (宝酒造社製) 7.5  $\mu$ l、制限酵素 SmaI 0.3  $\mu$ l を加えて 22°C で一晩反応させた。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第 15 図に示したプラスミド pKM2160VH41 および pKM2160VL61 を得た。

次にヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と上記で得られた pKM2160VH41 の 3  $\mu$ g をそれぞれ 30  $\mu$ l の 10mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、10mM 塩化マグネシウム および 1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10  $\mu$ l の 50mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100  $\mu$ g/ml BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKANTEX93 の約 12.75 kb、pKM2160VH41 の約 0.44kb の ApaI-NotI 断片をそれぞれ回収した。得

られた 2 種類の断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver.2 を用いて添付の説明書に従って連結し、得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA 各プラスミド DNA を調製して制限酵素処理により確認し、目的の約 0.44kb の ApaI-NotI 断片が挿入された第 16 図に示したプラスミド pKANTEK2160H を得た。

次に上記で得られた pKANTEK2160H と pKM2160VL61 の 3  $\mu$ g を 50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100  $\mu$ g/ml BSA からなる緩衝液に加え全量を 30  $\mu$ l とし、10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を加えて 55°C で 1 時間反応させた後、更に制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKANTEK2160H の約 13.20kb、pKM2160VL61 の約 0.41kb の EcoRI-BsiWI 断片をそれぞれ回収した。得られた 2 種類の断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver.2 を用いて添付の説明書に従って連結し、得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製して制限酵素処理により確認し、目的の約 0.41 kb の EcoRI-BsiWI 断片が挿入された第 17 図に示したプラスミド pKANTEK2160 を得た。該プラスミドに関して、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した結果、目的の KM2160H 鎖および L 鎖 V 領域 cDNA がクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

## (2) 抗 CCR4 キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

参考例 2 の 2 項 (1) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEK2160 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

プラスミド pKANTEX2160 を制限酵素 AatII（東洋紡績社製）で消化して直線状化した後、 $10\mu\text{g}$  を  $4\times 10^6$  細胞のラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞（ATCC CRL1662）へエレクトロポレーション法（Cytotechnology, 3, 133（1990））により導入後、40ml の H-SFM（GIBCO-BRL 社製）培地（FCS を 5% 添加）に懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレート（住友ベークライト社製）に  $200\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 1mg/ml になる様に添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を参考例 2 の 2 項（3）に示す ELISA 法（二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ )抗体を使用）により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 1mg/ml、dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTX と表記する：Sigma 社製）を 50nM 含む H-SFM 培地に  $1\sim 2\times 10^5$  細胞/ml になる様に懸濁し、24 ウェルプレート（Greiner 社製）に 1ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 2 の 2 項（3）に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 1mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む H-SFM 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、抗 CCR4 キメラ抗体の発現の最も高い形質転換細胞クローンを KM2760 と命名した。KM2760 の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量は約  $5\mu\text{g}/10^6$  細胞/24 時間であった。また、KM2760 の抗体 H 鎖 C 領域はヒト

IgG1 サブクラスである。なお、KM2760 は平成 12 年 2 月 24 日付で、通商産業省 工業技術院生命工学工業技術研究所（現名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（現住所：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6））に FERM BP-7054 として国際寄託されている。

### 参考例 3

hCCR4 高発現細胞の確立：

#### (1) 動物細胞用発現ベクターCAG-pcDNA3 の構築

動物細胞用発現ベクターpcDNA3（INVITROGEN 社）のプロモーター領域をサイトメガロウィルス（CMV）から CAG（AG（モディファイド チキン  $\beta$ アクチン）プロモーター ウィズ CMV-IE エンハンサー）に変更した発現ベクター（CAG-pcDNA3）を作製し、CCR4 遺伝子を組み込むことで発現ベクターを以下のように構築した。

5  $\mu$ g の pcDNA3 を制限酵素 NruI（宝酒造社製）で 37°C、1 時間反応させた後、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。次に制限酵素 HindIII（宝酒造社製）で 37°C、1 時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画後、CMV プロモーター領域を含まない約 5.8kb の DNA 断片を回収した。3  $\mu$ g の CAG プロモーター（Nuc. Acid. Res., 23, 3816 (1995)）領域を有するプラスミド CAG-pBluescript II KS (+) を SalI（宝酒造社製）で 37°C、1 時間反応後、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。DNA Blunting Kit（宝酒造社製）にて平滑末端化し、さらに HindIII で 37°C、1 時間反応してアガロースゲル電気泳動にて分画し、CAG プロモーター領域を含む約 1.8 kb の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて ligation し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、プラスミド CAG-pcDNA3 を得た。

## (2) hCCR4 発現ベクターの構築

参考例 3 の (1) で得られた CAG-pcDNA3 と hCCR4 DNA の組込まれた pcDNA3 (CCR4/pcDNA3) とを用いて以下のように hCCR4 発現ベクターを構築した。CAG-pcDNA3、CCR4/pcDNA3 共に HindIII で 37°C、1 時間反応させ、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。次に BglIII (宝酒造社製) で 37°C、1 時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画し、CAG プロモーター領域を含む約 2.0kb の DNA 断片と hCCR4 遺伝子領域を含む約 5.5kb の DNA 断片を回収した。以下、両 DNA 断片を参考例 3 の (1) と同様の方法を用いて、プラスミド CAG-CCR4/pcDNA3 を得た。

## (3) 動物細胞における hCCR4 の発現

動物細胞へのプラスミドの導入は、参考例 2 の 2 項 (2) と同様にエレクトロポレーション法にて行った。EL-4 細胞 (ATCC TIB-39) を PBS (-) (GIBCO BRL 社製) にて  $1 \times 10^7$  個/500  $\mu$ l に懸濁し、参考例 3 の (2) で得られた CAG-CCR4/pcDNA3 を 10  $\mu$ g 加えて氷中で 10 分間放置した後、専用キュベット (バイオラッド社製) に入れ、260V、500  $\mu$ FD で遺伝子導入を行った。さらに 10 分間氷中にて放置した後、10%FCS-RPMI 培地 200ml に懸濁し、96 ウェル細胞培養用プレートに 200  $\mu$ l/ウェルずつ分注した。24 時間後に培養上清を 100  $\mu$ l/ウェル除去し、1mg/ml の G418 を含む 10%FCS-RPMI 培地を 100  $\mu$ l/ウェルずつ分注し、最終濃度 0.5mg/ml とした。2 週間後、数十株のシングルクローンを選択して拡大培養した。

## (4) hCCR4 高発現細胞の選択

参考例 1 の (5) で作製されたハイブリドーマ細胞 KM2160 が生産するマウス抗体 KM2160 を用いて、蛍光抗体法で選択した。選択した数十株の遺伝子導入細胞各  $2 \times 10^5$  個を 96 ウェル U 字プレートに分注した。公知の方法 (酵素抗体法: 学際企画刊 (1985)) でビオチン標識した KM2160 を FACS 用緩衝液 (1%



BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05% $\text{NaN}_3$ 、pH7.4)で $5\mu\text{g/ml}$ に、また非特異的な染色を防ぐために、ヒトIgG(ウェルファイド社製)を $3.75\text{mg/ml}$ にそれぞれ希釈した抗体溶液を $200\mu\text{l}$ /ウェルとして加え、氷中で30分間反応させた。陰性対象としては、ビオチン化抗IL-5R抗体(W097/10354)を同濃度で用いた。緩衝液にて $200\mu\text{l}$ /ウェルで2回洗浄後、ストレプトアビジン-PE(日本ベクトン・ディッキンソン社製)を $20\mu\text{l}$ /ウェル加えた。遮光し氷中で30分間反応後、 $200\mu\text{l}$ /ウェルで3回洗浄し、最終的に $500\mu\text{l}$ に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、最も強い蛍光強度の株を1種類選択した。このhCCR4高発現細胞をCCR4/EL-4とする。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、ヒトCCR4に特異的に結合し、CCR4に対する新規なCDRを含む、遺伝子組換え抗体およびその抗体断片が提供される。本発明の抗体はCCR4関連疾患の診断あるいは治療に有用である。とくに免疫細胞染色におけるヒトTh2細胞等のCCR4発現細胞の免疫学的検出、気管支喘息、アトピー性皮膚炎を始めとするすべてのTh2介在性免疫疾患等のCCR4関連疾患や異常なTh2細胞等のCCR4発現細胞のバランスにより病態が進行する疾患、白血病のような血液癌を始めとする癌疾患の診断あるいは治療に有用である。

#### 配列フリーテキスト

配列番号4—人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号8—人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号9—人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号10—人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号11—人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号12—人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号13—人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号 14－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 16－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 17－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 18－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 19－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 20－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 21－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 22－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 23－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 24－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 26－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 27－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 28－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 29－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 30－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 31－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 32－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 33－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 34－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 35－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 38－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 39－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 40－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 41－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 42－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 43－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 44－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 45－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 46－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 47－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 49－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 50－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 51－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 52－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 53－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 54－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 55－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 56－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 57－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 58－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 59－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 60－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 65－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 66－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 67－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 68－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 69－人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 70－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 71－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 72－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 73－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 74－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 75－人工配列の説明：合成ペプチド  
配列番号 76－人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号 77－人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号 78－人工配列の説明：合成ペプチド

## 請 求 の 範 囲

1. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、ヒト血小板に反応性を示さないヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
2. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示すヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
3. CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示す請求の範囲 1 記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
4. 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 1～39、98～112、176～206 および 271～284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である請求の範囲 1～3 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
5. 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 2～29 番目に存在するエピトープである請求の範囲 1～4 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
6. 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 13～29 番目に存在するエピトープである請求の範囲 1～5 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。
7. 細胞外領域が、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目に存在するエピトープである請求の範囲 1～6 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

8. CCR4 発現細胞に特異的に反応する請求の範囲 1～7 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

9. CCR4 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞障害活性を示す請求の範囲 1～8 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

10. 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性である請求の範囲 2～9 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

11. ADCC 活性が CCR4 発現細胞の細胞死を誘導することによるものである請求の範囲 10 記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

12. CCR4 発現細胞を除去する作用を示す抗体である請求の範囲 1～11 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

13. CCR4 発現細胞が Th2 細胞である請求の範囲 8～12 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

14. Th2 細胞が産生するサイトカイン産生を抑制する活性を示す請求の範囲 1～13 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

15. サイトカインが、IL-4、IL-5、または IL-13 である請求の範囲 14 記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

16. ヒト抗体 IgG 型に属する請求の範囲 1～15 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

17. CCR4 に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求の範囲 1～16 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

18. CCR4 に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、請求の範囲 1～17 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

19. CCR4 に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) および L 鎖 C 領域を含む、請求の範囲 1～18 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

20. それぞれ配列番号 1、2、3 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1～19 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

21. それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1～20 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

22. それぞれ配列番号 1、2、3 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（L 鎖）V 領域の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3 を含む、請求の範囲 1～21 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

23. 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1～22 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

24. 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 38 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala のうち少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1～22 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

25. 抗体の軽鎖（L 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目 Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1～24 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

26. 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala、ならびに抗体の軽鎖（L 鎖）V 領域が、



配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1～23 および 25 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

27. 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 38 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala、ならびに抗体の軽鎖（L 鎖）V 領域が、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1～22、24 および 25 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

28. 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 4、9、10、11、38、39、40 および 41 から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求の範囲 1～22 および 25 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

29. 抗体の軽鎖（L 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 8、12、13 および 14 から選ばれるアミノ酸配列を含む請求の範囲 1～24 および 28 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

30. 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 4、9、10、11、38、39、40 および 41 から選ばれるアミノ酸配列、ならびに抗体の軽鎖（L 鎖）V 領域が、配列番号 8、12、13 および 14 から選ばれるアミノ酸配列を含む請求の範囲 1～22 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

31. 抗体の重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）が、配列番号 9 または 10 で示されるアミノ酸配列、および抗体の軽鎖（L 鎖）V 領域が配列番号 14 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 1～22 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

32. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1 本鎖抗体（scFv）、2 量体化可変領域（V 領域）断片（Diabody）、ジスルフィド安定化 V 領域断片（dsFv）および相補性決定領域（CDR）を含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求の範囲 1～31 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

33. 形質転換株 KM8759（FERM BP-8129）または KM8760（FERM BP-8130）が生産するヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

34. 請求の範囲 1～33 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片を生産する形質転換株。

35. 形質転換株が、KM8759（FERM BP-8129）または KM8760（FERM BP-8130）である請求の範囲 34 記載の形質転換株。

36. 請求の範囲 34 または 35 記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求の範囲 1～33 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とするヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片を生産する形質転換株の製造方法。

37. 請求の範囲 1～33 のいずれか 1 項に記載されたヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合しているヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片。

38. 請求の範囲 1～33 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片をコードする DNA。

39. 請求の範囲 38 記載の DNA を含有する組換えベクター。

40. 請求の範囲 39 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

。

41. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する医薬。

42. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する CCR4 関連疾患の治療薬。

43. CCR4 関連疾患が癌または炎症性疾患である請求の範囲 42 記載の治療薬。

44. 癌が血液癌である請求の範囲 43 記載の治療薬。

45. 血液癌が白血病またはリンパ腫である請求の範囲 44 記載の治療薬。

46. 炎症性疾患が、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 43 記載の治療薬。

47. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する CCR4 関連疾患の診断薬。

48. CCR4 関連疾患が癌または炎症性疾患である請求の範囲 47 記載の診断薬。

49. 癌が血液癌である請求の範囲 48 記載の診断薬。

50. 血液癌が白血病またはリンパ腫である請求の範囲 48 記載の診断薬。

51. 炎症性疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 48 記載の診断薬。

52. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する Th2 介在性免疫疾患の治療薬。

53. Th2 介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 52 記載の治療薬。

54. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する Th2 介在性免疫疾患の診断薬。

55. Th2 介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 54 記載の診断薬。

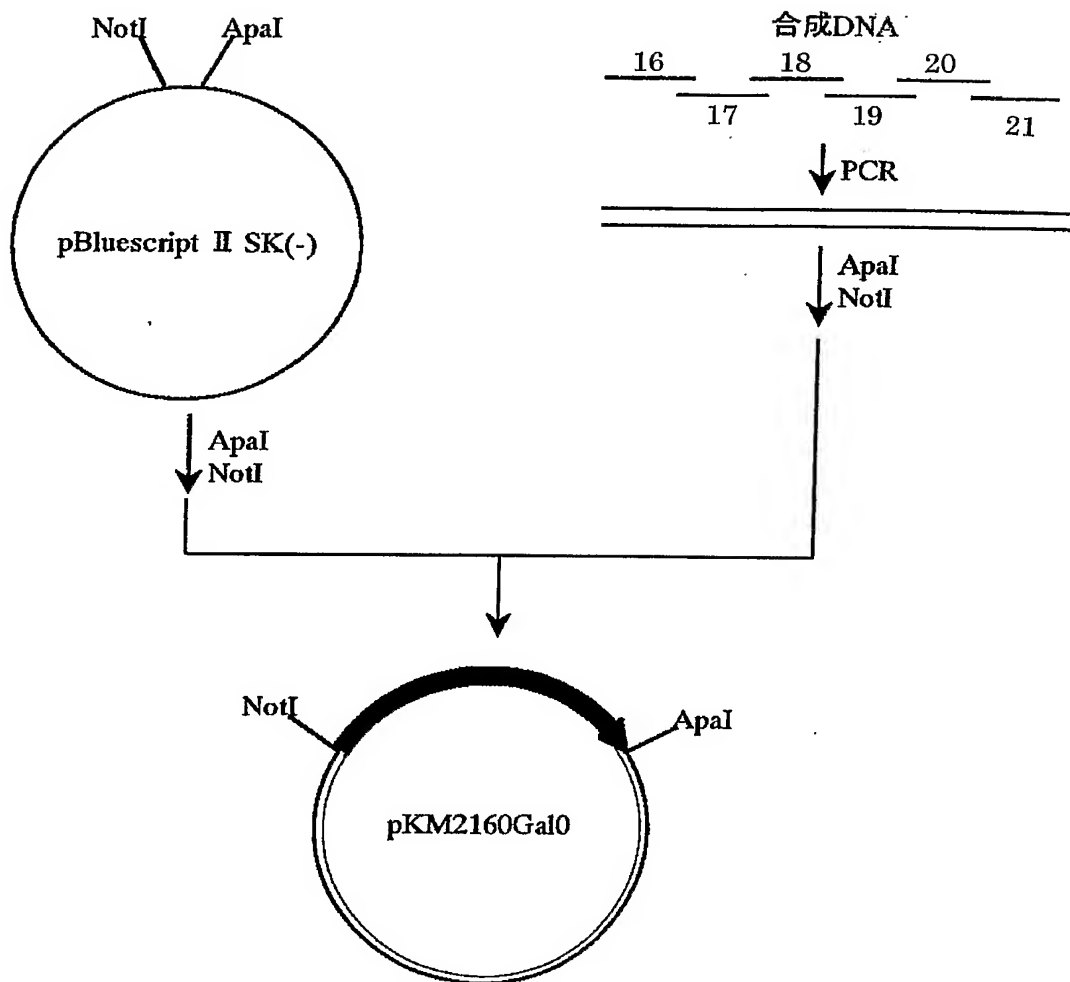
56. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4 を免疫学的に検出する方法。

57. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

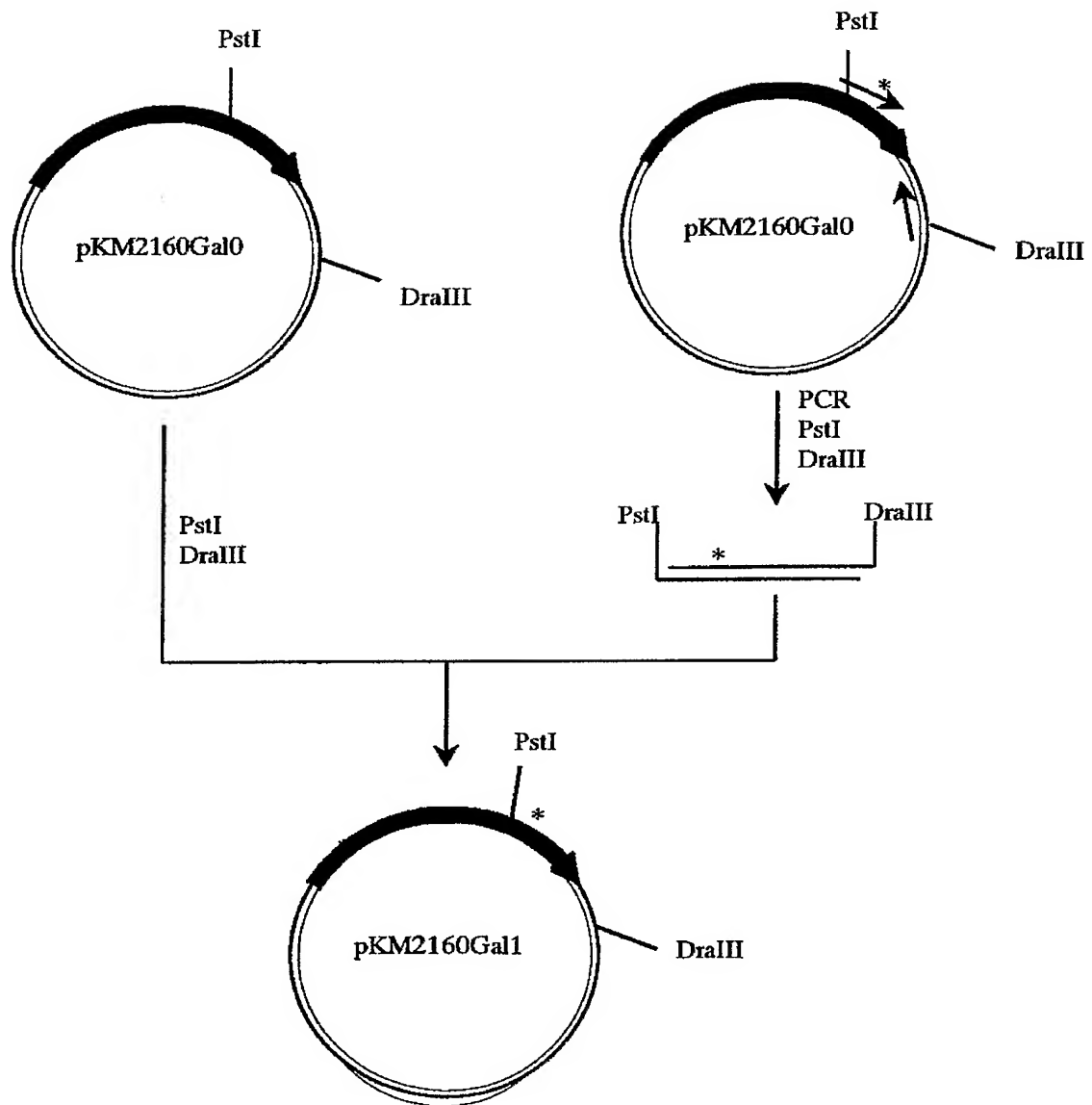
58. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を減少または除去する方法。

59. 請求の範囲 1～33 および 37 のいずれか 1 項に記載のヒト型 CDR 移植抗体およびその抗体断片を用いて、Th2 細胞が産生するサイトカインを抑制する方法。

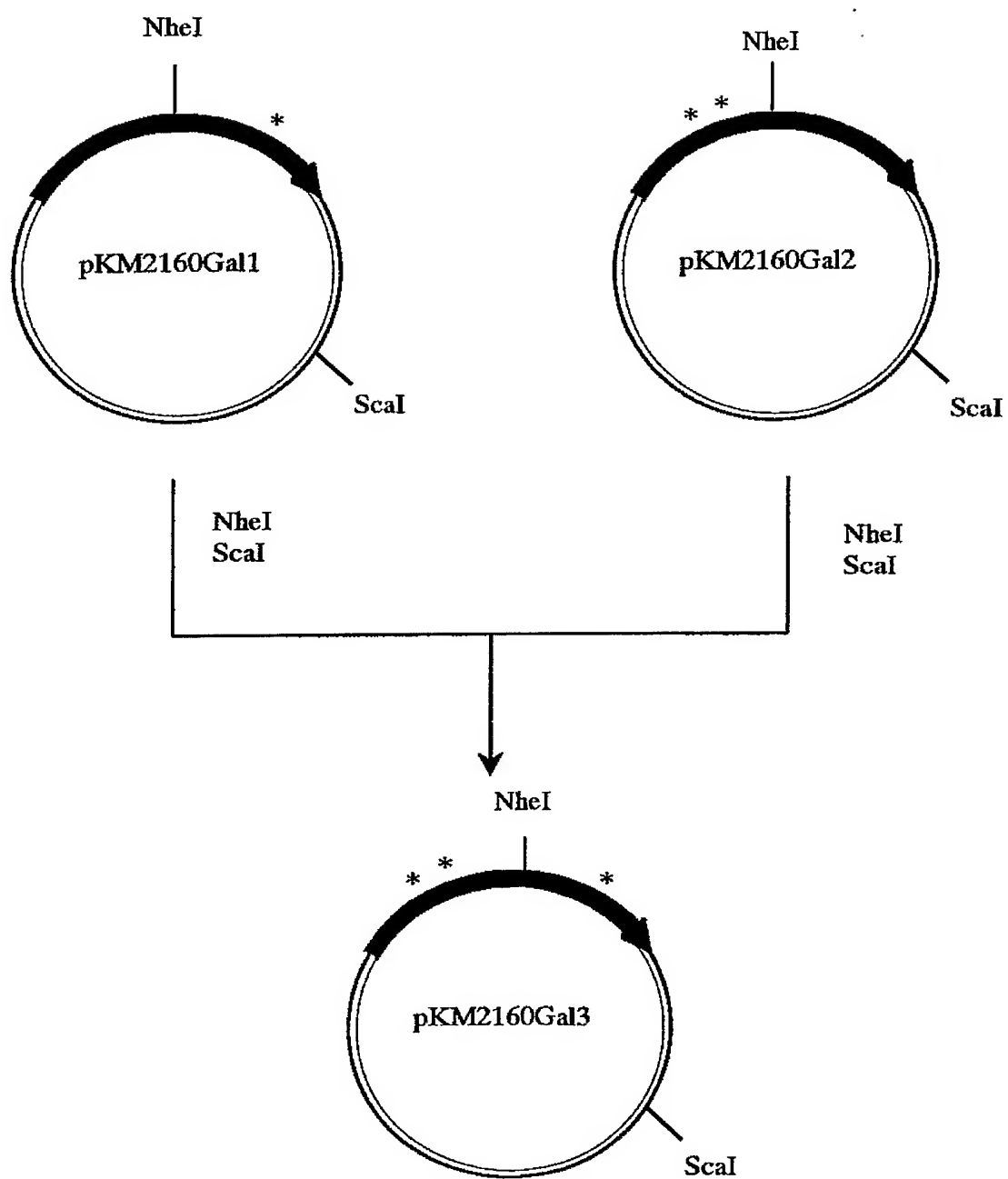
第1図



第2図

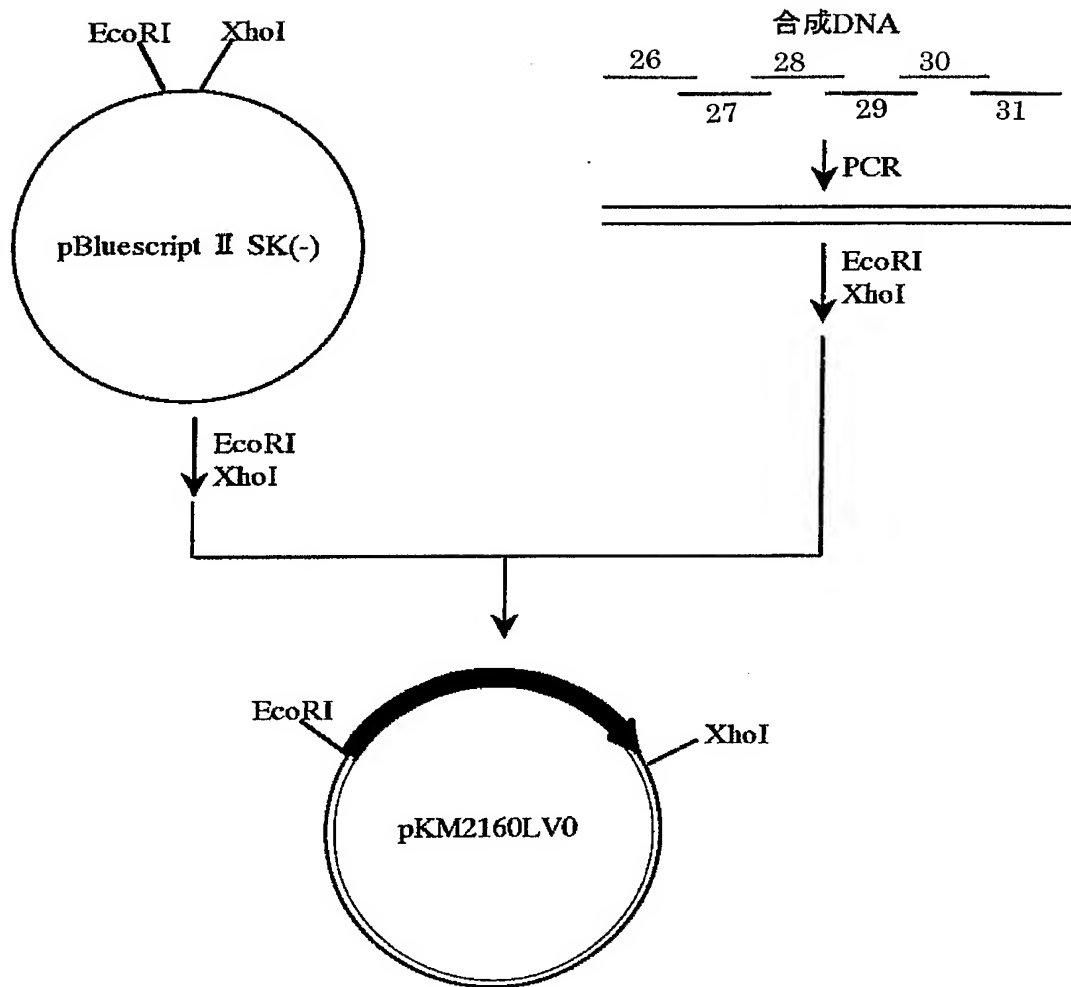


第3図

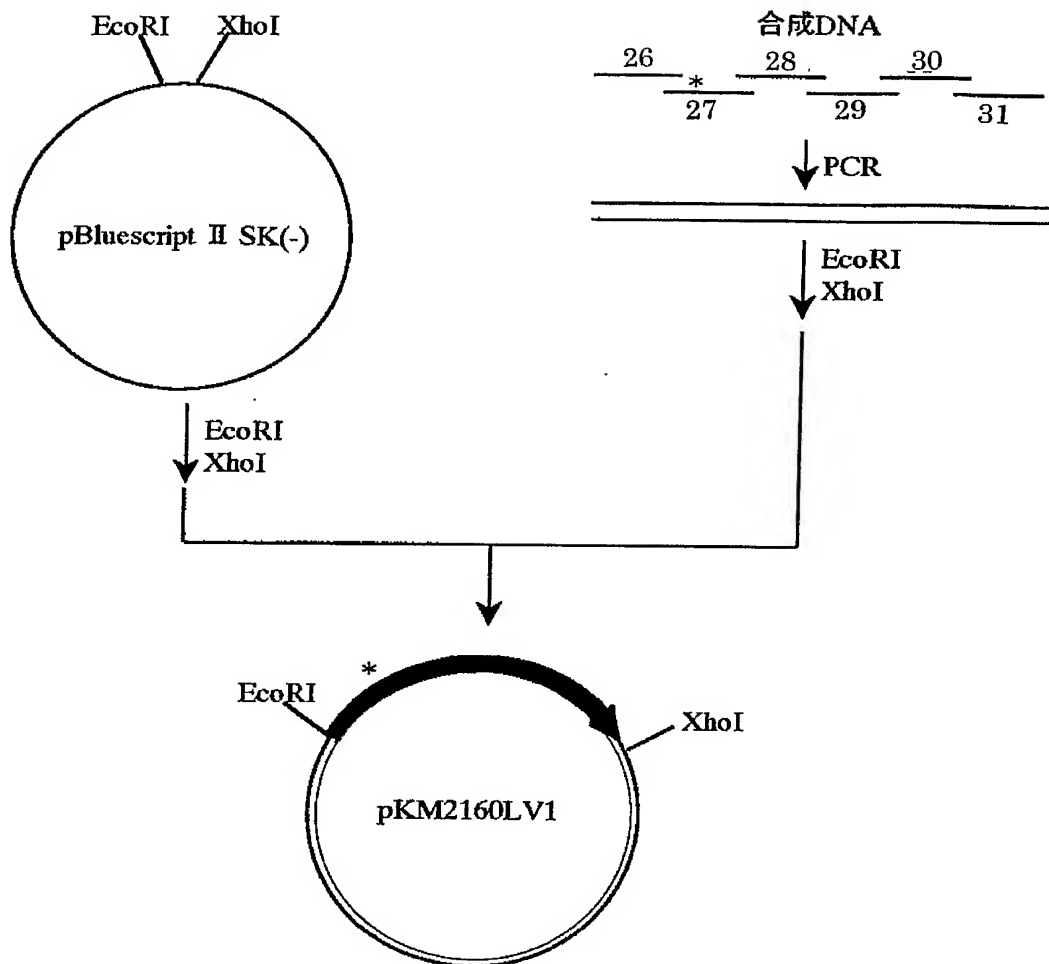




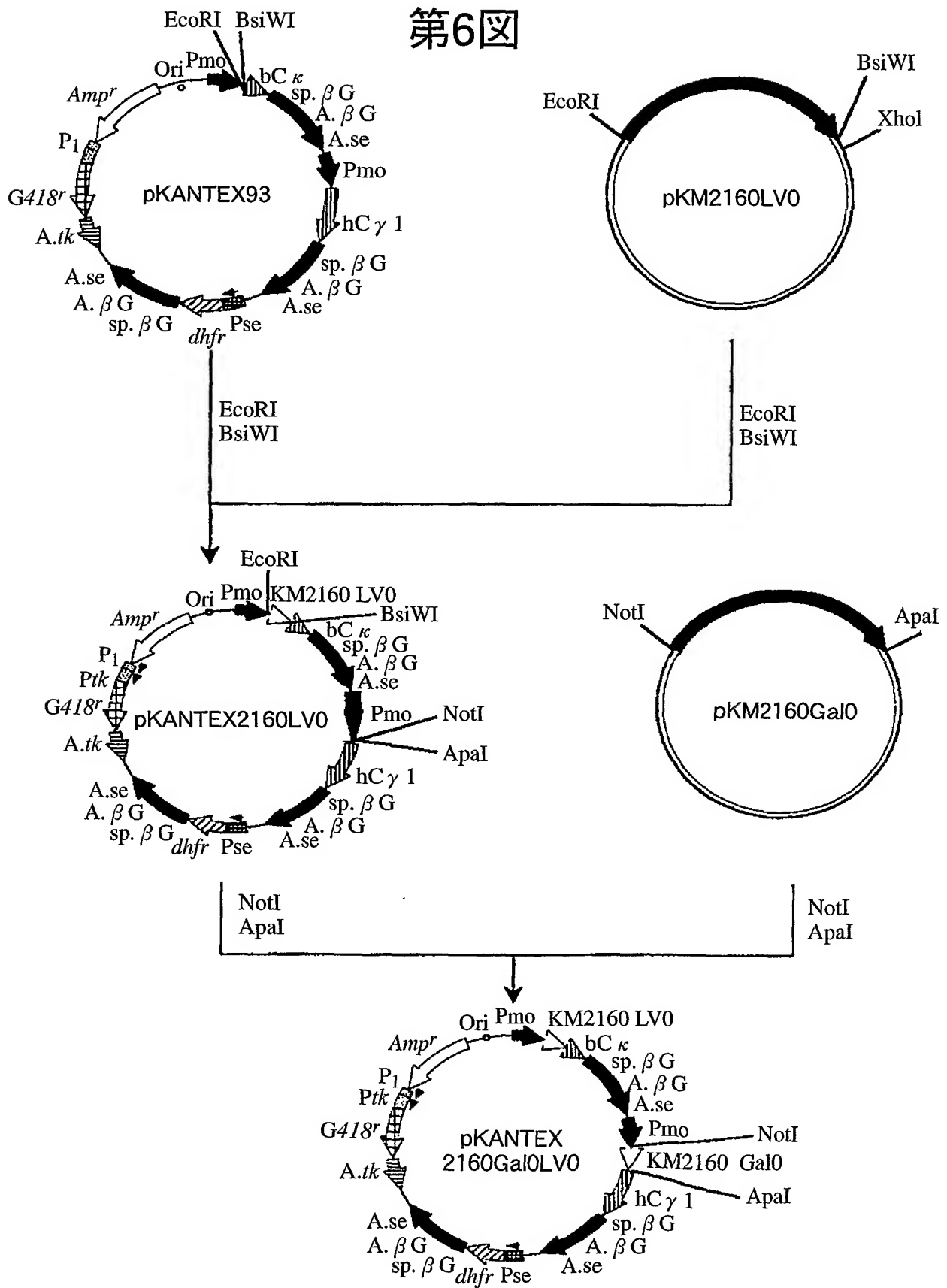
第4図



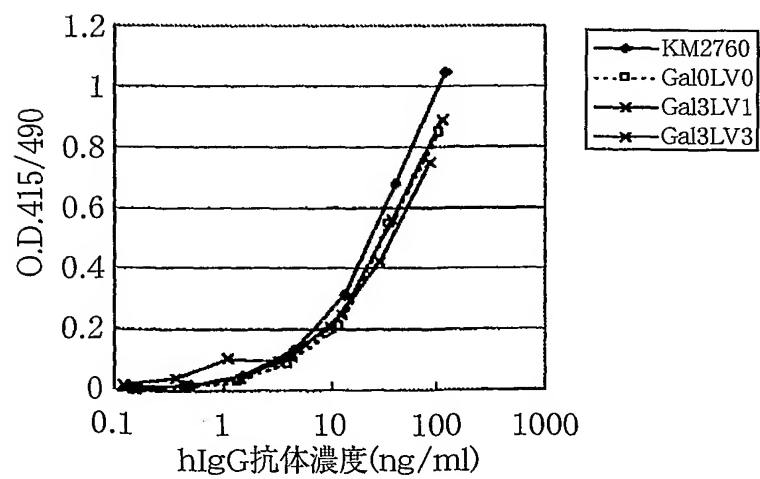
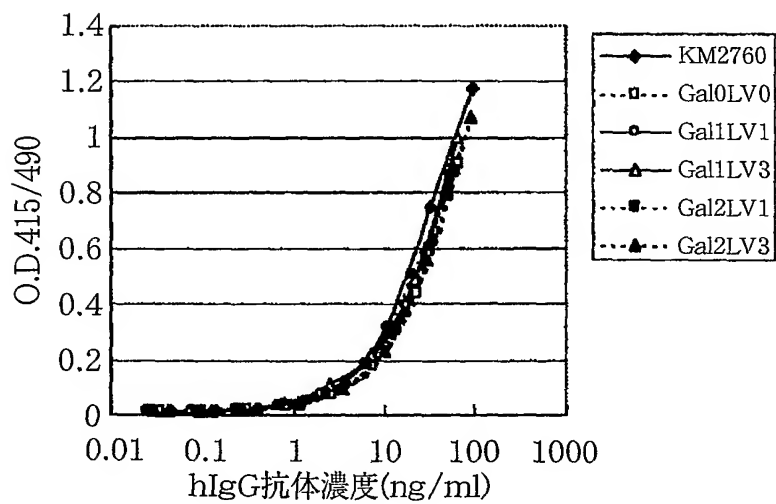
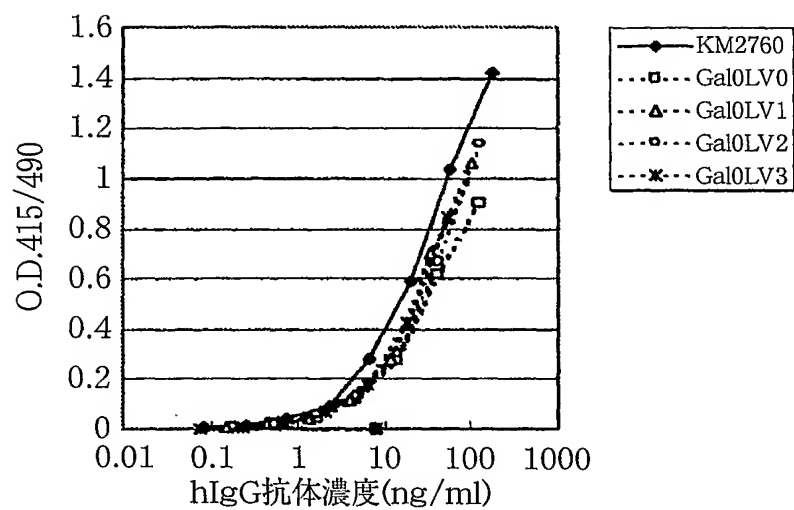
第5図



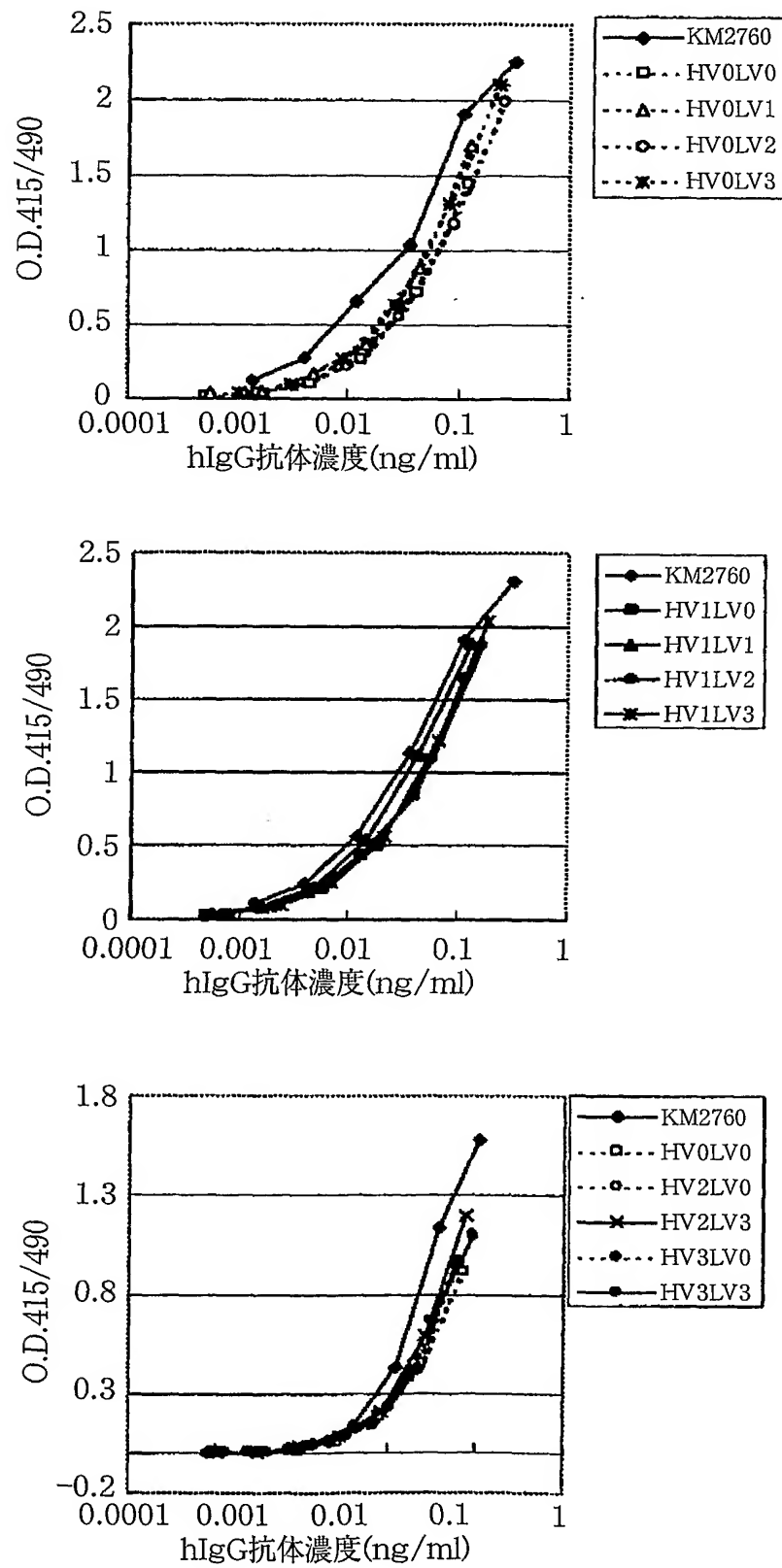
## 第6図



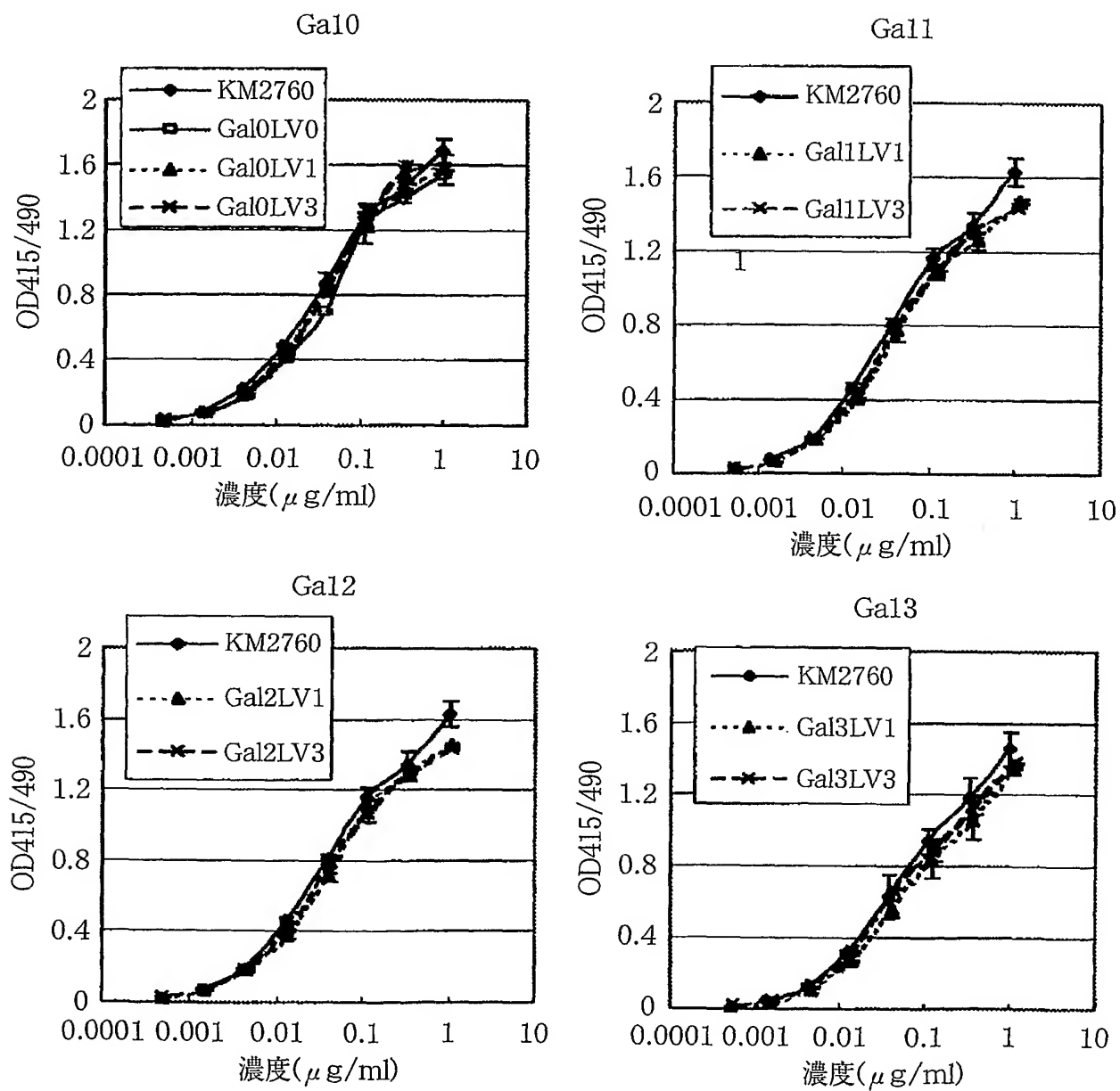
## 第7図



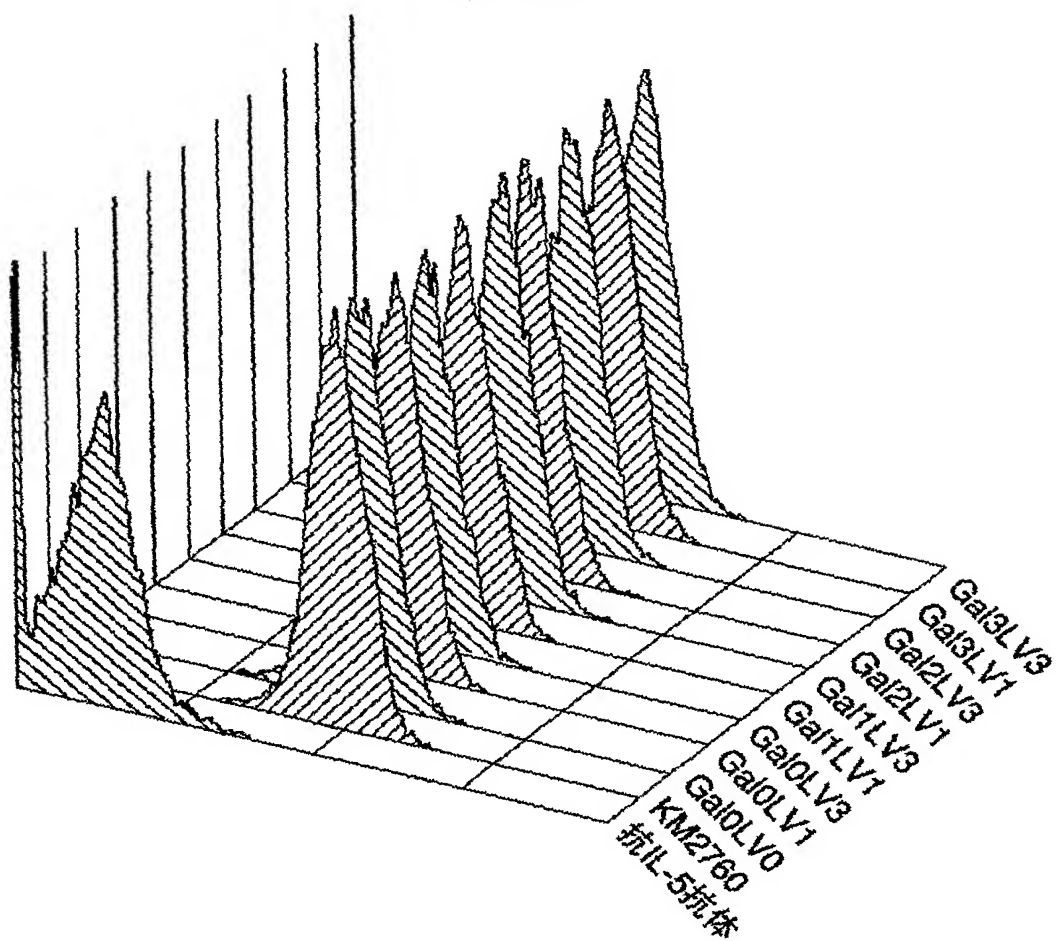
## 第8図



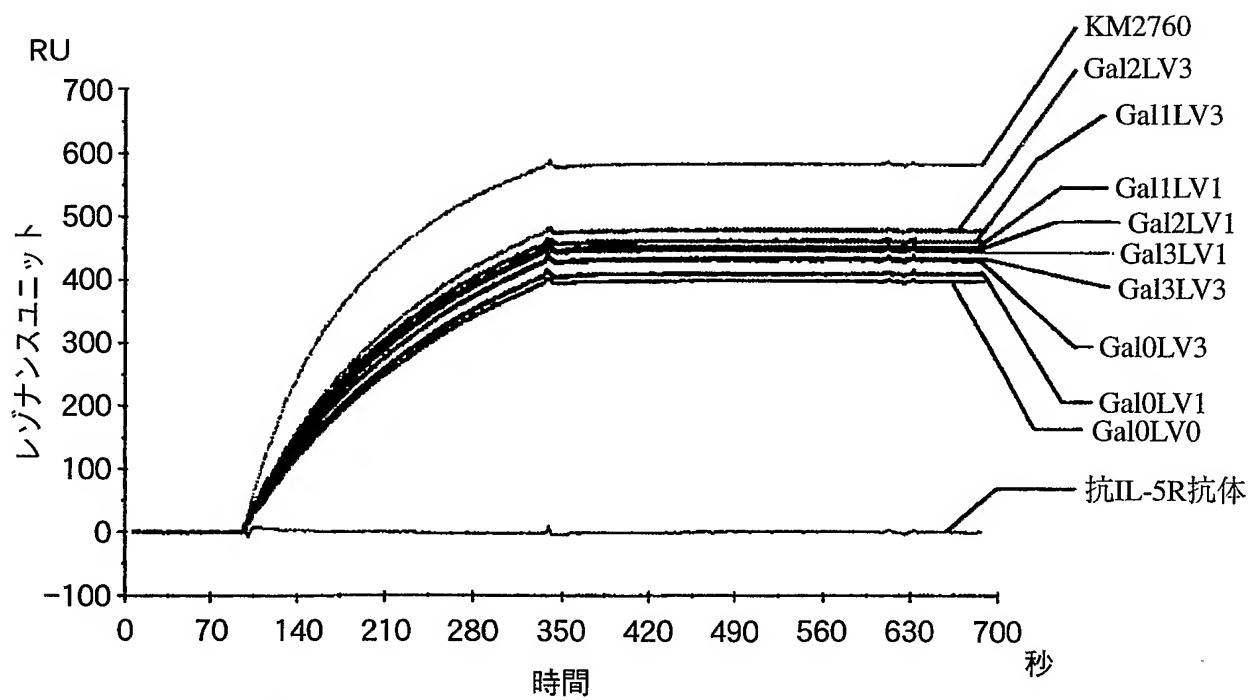
## 第9図



第10図

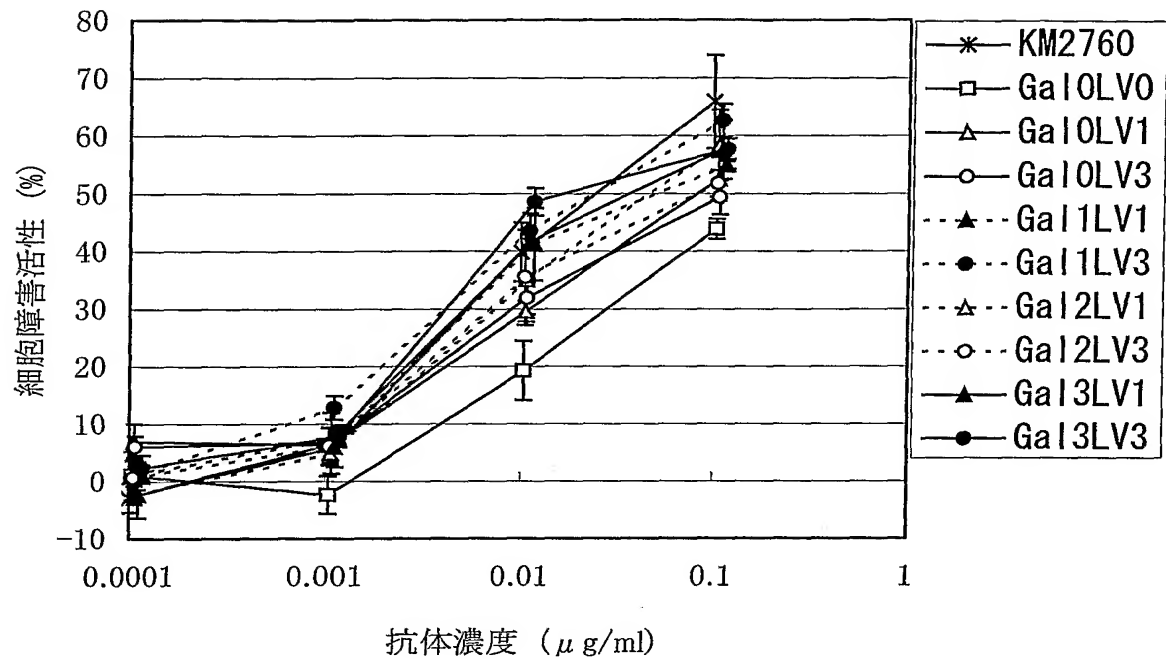


## 第11図

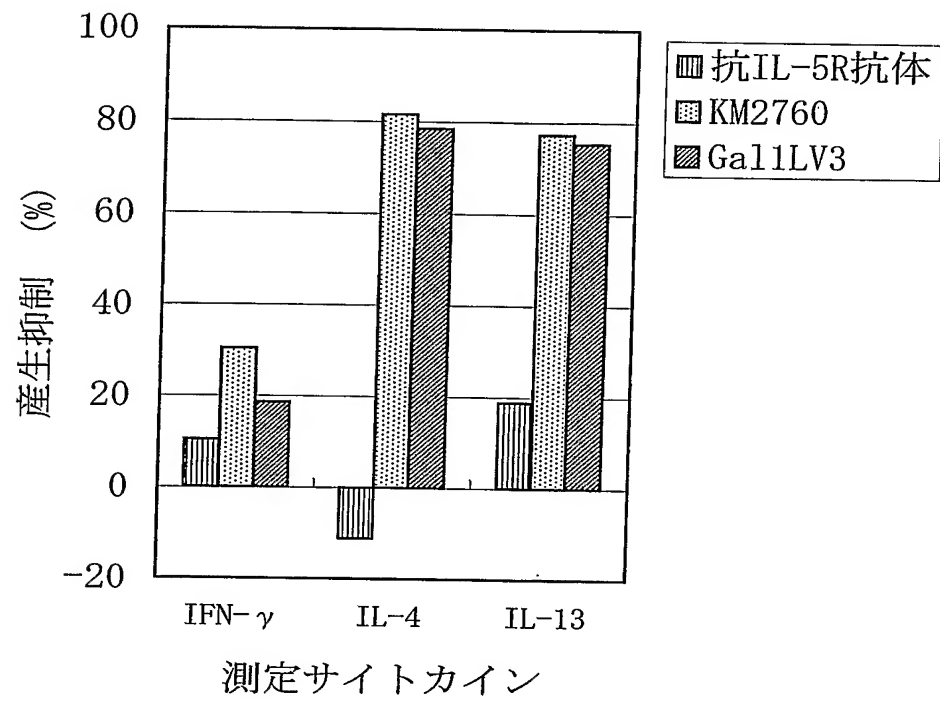




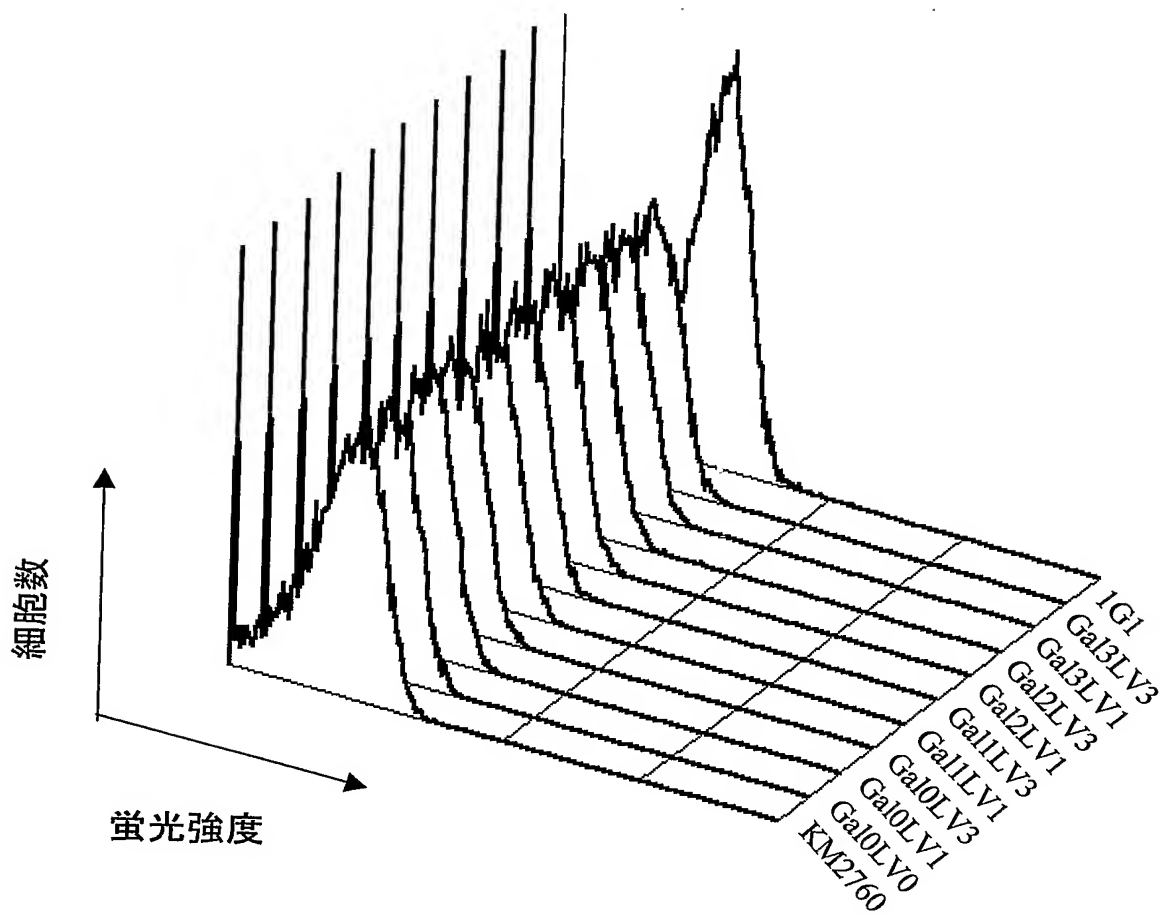
第12図



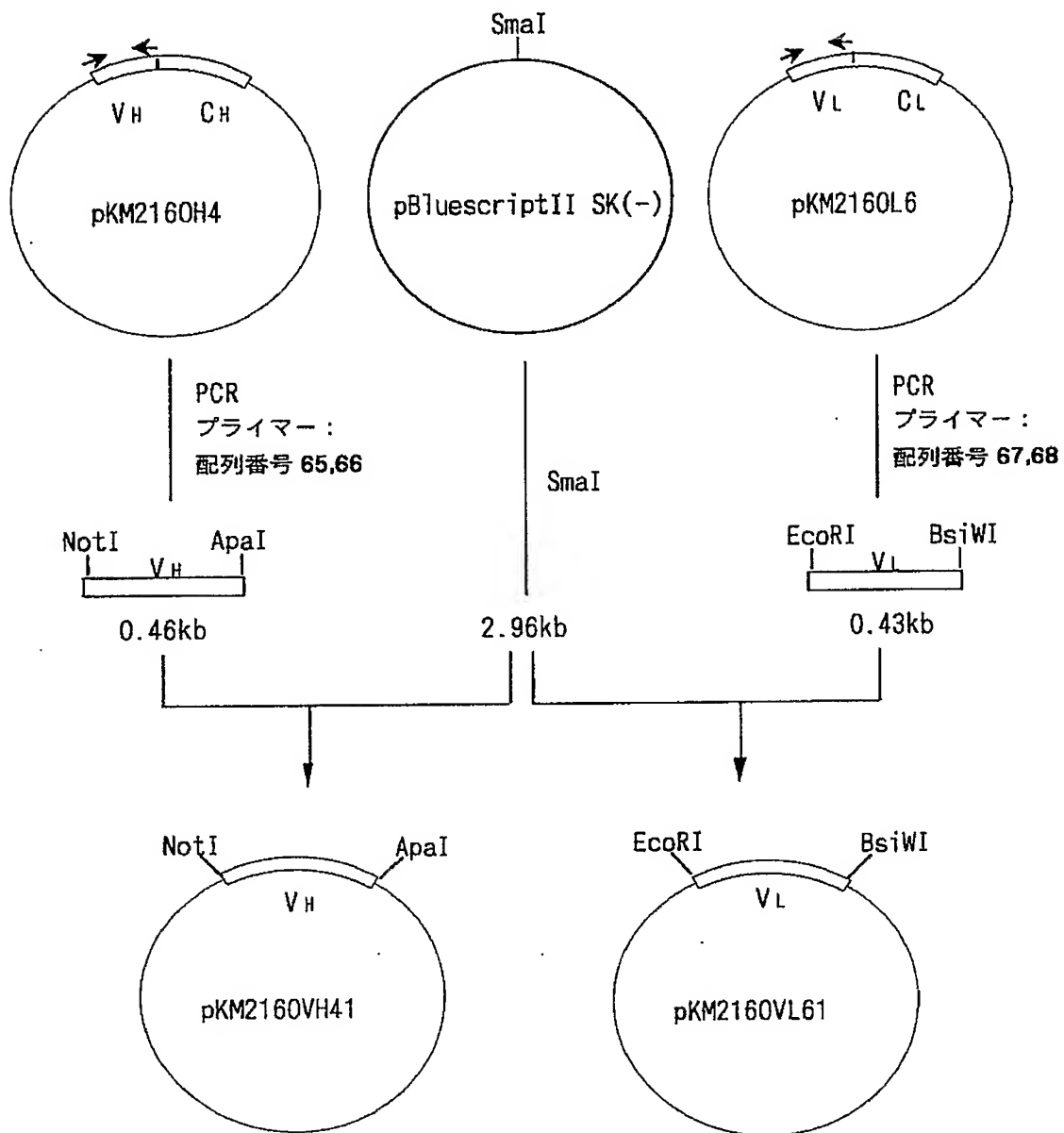
第13図



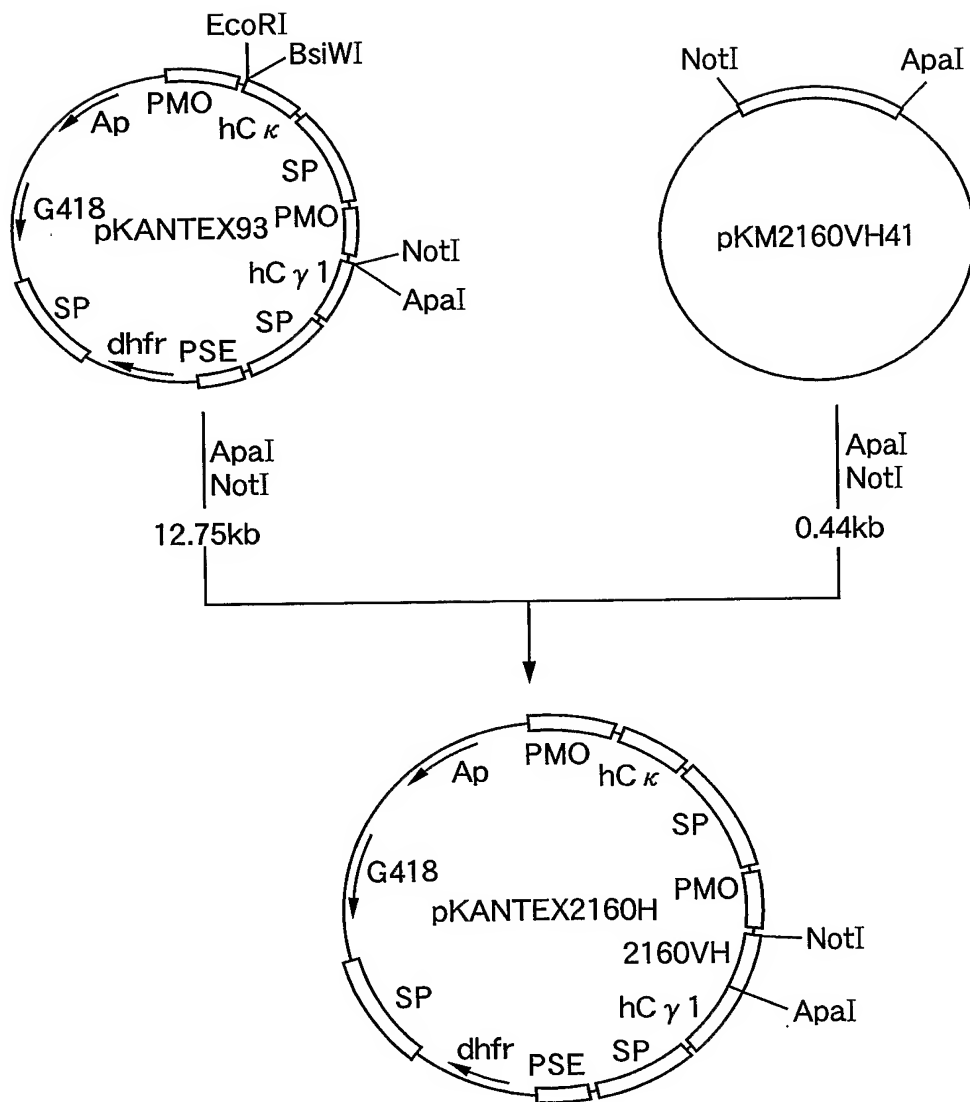
第14図



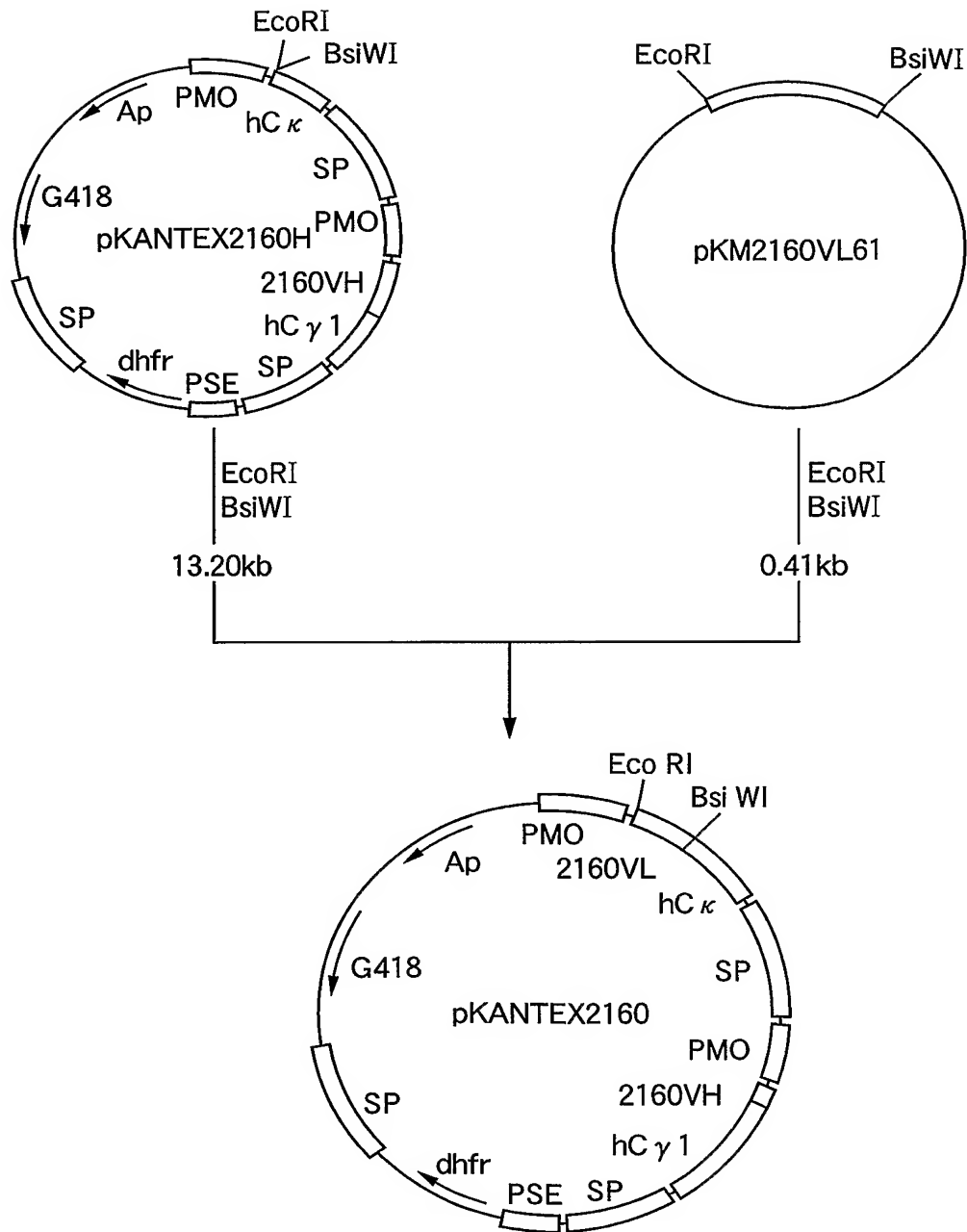
## 第15図



## 第16図



## 第17図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Human CDR grafted antibody and antibody fragment thereof

<130> P-41263

<150> JP 2001-265144

<151> 2001-08-31

<160> 78

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asn	Tyr	Gly	Met	Ser
1				5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

His	Ser	Asp	Gly	Asn	Phe	Ala	Phe	Gly	Tyr
1				5					10

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

&lt;400&gt; 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 5

Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 7



Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr  
1 5

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50                                      55                                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
   65                                      70                                      75                                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
                                     85                                      90                                      95  
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
                                     100                                      105                                      110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                                     115

<210> 10  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<400> 10  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg  
   1                                      5                                      10                                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
                                     20                                      25                                      30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
                                     35                                      40                                      45  
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
                                     50                                      55                                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
   65                                      70                                      75                                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
                                     85                                      90                                      95  
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
                                     100                                      105                                      110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                                     115

<210> 11  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 12

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
 20 25 30  
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                             85                            90                            95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                             100                            105                            110

<210> 13  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<400> 13  
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
   1                            5                            10                            15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
                             20                            25                            30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                             35                            40                            45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                             50                            55                            60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
   65                            70                            75                            80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                             85                            90                            95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                             100                            105                            110

<210> 14  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<400> 14  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
   1                            5                            10                            15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
                             20                            25                            30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
           35                                  40                                  45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                                  55                                  60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
           65                                  70                                  75                                  80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                                   85                                  90                                  95  
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                                   100                                  105                                  110

<210> 15  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 15  
 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
       1                                  5                                  10                                  15

Val Gln Cys

<210> 16  
 <211> 98  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 16  
 aacagctatg accatggcgg ccgcgacccc tcaccatgaa cctcgggctc agtttgattt 60  
 tccttgccct cattttaaaa ggtgtccagt gtgaggtg 98

<210> 17  
 <211> 97  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 17  
 atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggacctcc caggctgtac caagtctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 18  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 18  
tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggtcca 60  
gggaaggggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtgc 98

<210> 19  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 19  
acaggagatt cttggcattg tctctggaga tggatgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60  
aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgcgacc 98

<210> 20  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 20  
acaatgccaa gaactccctg tatctgcaga tgaacagcct gagagtcgag gacacggccc 60  
tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 21  
<211> 96  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 21  
 gtaaaacgac ggccagtggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60  
 ggccccaata accaaacgcg aagtttccat cgctat 96

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 22  
 gatggttcac gtagtgg 17

<210> 23  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 23  
 ctgtatctgc agatgaacag cctgagagtc gaggacacgg ccctgtatta ctgtggaaga 60  
 c 61

<210> 24  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 24  
 gaataagtgc tagcactact aatggttgcg acccactcca gcctcttgtc tggagc 56

<210> 25  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400>25  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
 1 5 10 15

Ser Ser Ser

<210> 26  
<211> 92  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 26  
aacagctatg accatggaat tcgcctcttc aaaatgaagt tgcctgttag gctgttggtg 60  
ctgatgttct ggattcctgc ttccagcagt ga 92

<210> 27  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 27  
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60  
gagtcacac gatatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 28  
<211> 92  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 28  
ctccatctcc tgcagatcta gtcggaacat tgttcatatt aatggtgaca catattttaga 60  
atggtacctg cagaagccag gccagtctcc ac 92

<210> 29  
<211> 93  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA



<400> 29  
tgtgcctgac ccaactgccac tgaacctgtc tgggacccca gaaaatcggg ttgaaacttt 60  
atagatcagg agctgtggag actggcctgg ctt 93

<210> 30  
<211> 92  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 30  
tggcagtggg tcaggcacag atttcacact gaaaatcagc agagtggagg ctgaggatgt 60  
tggggtttat tactgctttc aaggttcact tc 92

<210> 31  
<211> 91  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 31  
gtaaaacgac ggccagtctc gagcgtacgt ttgatttcca ccttggtccc ttggccgaac 60  
gtccacggaa gaagtgaacc ttgaaagcag t 91

<210> 32  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 32  
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 33  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 33  
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60  
gagtcatac aacatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 34  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 34  
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60  
gagtcataa gatatactg ctggaagcag gaat 94

<210> 35  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic DNA

<400> 35  
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60  
gagtcataa aacatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 36  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser  
1 5 10 15  
Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys  
20 25

<210> 37  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 37

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys  
 1 5 10 15

Pro Cys

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
                     20                    25                    30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                     35                    40                    45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
                     50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
                     65                    70                    75                    80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                     85                    90                    95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
                     100                    105                    110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115

<210> 40  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<400> 40  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
   1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
                     20                    25                    30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                     35                    40                    45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
                     50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
                     65                    70                    75                    80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                     85                    90                    95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
                     100                    105                    110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic peptide

<400> 41  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 42  
 <211> 97  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 42  
 gtgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60  
 ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 43  
 <211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 43

tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60

gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 44

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 44

acagcgtgtt cttggaattg tctctggaga tggatgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60

aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgagacc 98

<210> 45

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 45

acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60

tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 46

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 46

tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60

gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 47  
 <211> 98  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 47  
 acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60  
 tgtattactg tggaagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 48  
 <211> 360  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48  
 Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu  
 35 40 45  
 Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu  
 50 55 60  
 Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met  
 100 105 110  
 Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val  
 115 120 125  
 Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe  
 130 135 140  
 Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser  
 165 170 175

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser  
 180 185 190  
 Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile  
 195 200 205  
 Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met  
 210 215 220  
 Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala  
 225 230 235 240  
 Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr  
 245 250 255  
 Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val  
 260 265 270  
 Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala  
 275 280 285  
 Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr  
 290 295 300  
 Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys  
 305 310 315 320  
 Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln  
 325 330 335  
 Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met  
 340 345 350  
 Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu  
 355 360

<210> 49  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (357)  
 <223> Synthetic DNA

<400> 49

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15



```

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
      20              25              30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
      50              55              60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65              70              75              80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
      85              90              95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
      100              105              110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 50  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(357)  
 <223> Synthetic DNA

```

<400> 50
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
  1              5              10              15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
      20              25              30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45

```

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192  
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Pro Asp Ser Val  
           50                          55                          60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
           65                          70                          75                          80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
                                   85                          90                          95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336  
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
                           100                          105                          110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           115

<210> 51

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

<223> Synthetic DNA

<400> 51

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg  
           1                          5                          10                          15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr  
                           20                          25                          30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
           35                          40                          45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192  
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
           50                          55                          60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
           65                          70                          75                          80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288



115

<210> 53  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(336)  
 <223> Synthetic DNA

<400> 53  
 gat atc gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
 20 25 30  
 aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144  
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336  
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 54  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(336)  
 <223> Synthetic DNA

&lt;400&gt; 54

gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144  
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336  
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(336)

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 55

gat atc ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48  
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144  
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                          55                          60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
           65                          70                          75                          80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                                   85                          90                          95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336  
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                           100                          105                          110

<210> 56  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (336)  
 <223> Synthetic DNA

<400> 56  
 gat gtt ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
           1                          5                          10                          15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile  
                           20                          25                          30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144  
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                           35                          40                          45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                          55                          60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
           65                          70                          75                          80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                                   85                          90                          95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 57  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(357)  
 <223> Synthetic DNA

<400> 57  
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192  
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336  
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 58  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence





```

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
      20              25              30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
      50              55              60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65              70              75              80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
      100              105              110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

357

<210> 60  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(357)  
 <223> Synthetic DNA

```

<400> 60
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
      1              5              10              15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
      20              25              30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45

```

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192  
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
           50                          55                          60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
           65                          70                          75                          80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                           85                          90                          95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336  
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
                           100                          105                          110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           115

<210> 61  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(414)

<400> 61  
 atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48  
 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
           1                          5                          10                          15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96  
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys  
                           20                          25                          30

cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc 144  
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe  
           35                          40                          45

agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg 192  
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu  
           50                          55                          60

gaa tgg gtc gca acc att agt agt gct agt act tat tcc tat tat cca 240  
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro  
           65                          70                          75                          80

gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac 288  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

```

                85                90                95
tcc cta tat ctg caa atg aat agt ctg agg tct gag gac aca ggc ata 336
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile
                100                105                110

tat tac tgt gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg 384
Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp
                115                120                125

ggc cga ggg act ctg gtc act gtc tct gca
Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
                130                135

```

<210> 62  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

```

<400> 62
Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
  1                5                10                15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys
                20                25                30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
                35                40                45

Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu
                50                55                60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro
                65                70                75                80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn
                85                90                95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile
                100                105                110

Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp
                115                120                125

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
                130                135

```

<210> 63  
 <211> 396  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (396)

&lt;400&gt; 63

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
     1                    5                    10                    15

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96  
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
             20                    25                    30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cgg aac att 144  
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile  
             35                    40                    45

gtt cat att aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aga ccg 192  
 Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro  
             50                    55                    60

ggc cag tct cca aag ctc cta atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240  
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
     65                    70                    75                    80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
             85                    90                    95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Gln Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys  
             100                    105                    110

ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384  
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu  
             115                    120                    125

gaa atc aga cgg 396  
 Glu Ile Arg Arg  
     130

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 64

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
     1                    5                    10                    15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

20                      25                      30  
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile  
           35                      40                      45  
 Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro  
           50                      55                      60  
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
           65                      70                      75                      80  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
                                  85                      90                      95  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys  
                                  100                      105                      110  
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu  
                                  115                      120                      125  
 Glu Ile Arg Arg  
           130

<210> 65  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 65  
 aaggaaaaaa gcggccgcga cccctcacca tgaacctcg 39

<210> 66  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic DNA

<400> 66  
 cgatgggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccag 39

<210> 67  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 67

ccggaattcg cctcctcaaa atgaagttgc c

31

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 68

agccaccgta cgtctgattt ccagcctggt g

31

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 97

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 69

atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt

97

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 70

Asn	Pro	Thr	Asp	Ile	Ala	Asp	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser
1				5					10					15	

Asn	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Lys	Pro	Cys
			20					25			

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 71

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Cys

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 72

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro  
1 5 10 15

Cys

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 73

Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys  
1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 74

Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys  
1 5 10 15

<210> 75  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 75  
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Cys  
1 5 10

<210> 76  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 76  
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Cys  
1 5 10

<210> 77  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 77  
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Cys  
1 5 10

<210> 78  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 78  
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Cys  
1 5 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08828

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/10, 15/13, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/10, 15/13, C12P21/08, A61K39/395,  
A61P35/00, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Andrew DP, et al., C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both and Th1 and Th2 potential. J. Immunol. 01 January, 2001 (01.01.01), Vol.166, No.1, pages 103 to 111	1-59
Y	IMAI T. et al., Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. Int. Immunol. 1999, Vol.11, No.1, pages 81 to 88	1-59
Y	Landolfi NF, et al., The integrity of the ball-and-socket joint between V and C domains is essential for complete activity of a humanized antibody. J. Immunol. 01 February, 2001 (01.02.01), Vol.166, No.3, pages 1748 to 1754	1-59

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November, 2002 (20.11.02)

Date of mailing of the international search report

03 December, 2002 (03.12.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/10, 15/13, C12P21/08, A61K39/395, A61P35/00, G01N33/53			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/10, 15/13, C12P21/08, A61K39/395, A61P35/00, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	Andrew DP, et al., C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. J. Immunol. 2001. 01. 01, vol. 166, no. 1, p. 103-111	1-59	
Y	Imai T, et al., Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. Int. Immunol. 1999, vol. 11, no. 1, p. 81-88	1-59	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 20. 11. 02		国際調査報告の発送日 03.12.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Landolfi NF, et al., The integrity of the ball-and-socket joint between V and C domains is essential for complete activity of a humanized antibody. J.Immunol. 2001.02.01, vol.166, no.3, p.1748-1754	1-59
Y	He XY, et al., Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. J.Immunol. 1998.01.15, vol.160, no.2, p.1029-1035	1-59
Y	Brown PS Jr., et al., Anti-Tac-H, a humanized antibody to the interleukin 2 receptor, prolongs primate cardiac allograft survival. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1991.04.01, vol.88, no.7, p.2663-2667	1-59
Y	Co MS, et al., Humanized antibodies for antiviral therapy. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1991.04.01, vol.88, no.7, p.2869-2873	1-59
Y	Junghans RP, et al., Anti-Tac-H, a humanized antibody to the interleukin 2 receptor with new features for immunotherapy in malignant and immune disorders. Cancer Res. 1990, vol.50, no.5, p.1495-1502	1-59
Y	Queen C, et al., A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1989 vol.86, no.24, p.10029-10033	1-59